



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADOS DA BOCA E DO CORAÇÃO DE  
CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

MARTA MONTEIRO PAIS TAVARES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de  
Oliveira

Dra. Cláudia Margarida Palmela Beato  
Godinho Correia de Oliveira Miguel

ORIENTADOR

Dra. Cláudia Margarida Palmela Beato  
Godinho Correia de Oliveira Miguel

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São  
Braz

2014

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADOS DA BOCA E DO CORAÇÃO DE  
CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

MARTA MONTEIRO PAIS TAVARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de  
Oliveira

Dra. Cláudia Margarida Palmela Beato  
Godinho Correia de Oliveira Miguel

ORIENTADOR

Dra. Cláudia Margarida Palmela Beato  
Godinho Correia de Oliveira Miguel

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São  
Braz

2014

LISBOA

---





Pai,

Dedico-te este trabalho, por tudo o que, juntamente com a Mãe, fizeste por mim.

É a vocês que dedico cada pedaço de sucesso que atinjo na minha vida.



*If you're not prepared to be wrong, you'll never come up with anything original.*

Ken Robinson





## Agradecimentos

---

É difícil agradecer a cada pessoa que fez parte desta jornada; saibam que estou eternamente grata a todos os que me ajudaram na realização deste sonho. Não esqueço ninguém e peço desculpa àqueles que não sejam mencionados nestas páginas, desde já um grande obrigado!

Começo por agradecer à minha Mãe, por ser a melhor mãe do mundo, guiando-me ao longo da minha vida, levantando-me sempre que eu estou em baixo, festejando sempre as minhas pequenas vitórias e acreditando em mim mesmo quando eu deixo de acreditar... Acima de tudo, por ser um exemplo a seguir.

Ao meu Irmão, por ser uma inspiração para mim, por me ter ajudado com as dificuldades com que me deparei ao longo destes anos, pelas horas de conversas que teve comigo sempre com a intenção de que eu pudesse evoluir enquanto pessoa e profissional.

Ao João, por sempre se ter interessado por todos os meus objetivos e por me fazer ver as coisas de uma perspetiva não veterinária, por toda a ajuda e apoio em casa, por me mimar como se eu fosse sua filha, sem nunca esperar nada em troca.

Aos meus Avós e à minha Prima por todos os mimos e alegrias que só a família nos pode dar.

Um agradecimento especial à Dra. Cláudia, porque um dia ela decidiu acreditar e acolher de braços abertos uma jovem do 2º ano do mestrado integrado em medicina veterinária e desde aí me apoiou sempre sem restrições. Mais que minha orientadora, é um modelo a seguir e muito do que aprendi devo-lhe a ela.

À Profª. Doutora Berta São Braz, que além de co-orientadora foi uma amiga e conselheira, como uma segunda mãe, estando sempre disponível para mim, ainda que com trabalho até à cabeça. Por me ter apoiado com todas as minhas decisões, por ter sido uma força e um incentivo quando o desespero parecia tomar conta de mim.

À Doutora Teresa Semedo e à Doutora Manuela Oliveira, por terem acreditado nesta ideia desde o primeiro dia, por cada minuto que perderam comigo, por todo o incentivo que sempre me deram e a segurança que me transmitiram, pela independência que me deram sem me deixarem desamparada. Por toda a paciência e disponibilidade sempre imediata. Obrigada por terem tornado este sonho realidade.

Ao Prof. Doutor Luís Telo da Gama pela ajuda prestada na análise estatística dos dados deste trabalho.

Ao Dr. João, o impulsionador deste estudo, com a sua mente sempre aberta e atenta. Obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiu, por toda a paciência com que me acolheu, por todas as cirurgias que me permitiu assistir e por me mostrar que a humildade nos leva sempre longe.

Ao Dr. Rui por ter contagiado cada dia do meu estágio com a sua alegria e gosto de trabalhar, por me fazer perceber que a boa disposição pode ser o segredo para ultrapassar as dificuldades do dia-a-dia. Obrigada também por todos os ensinamentos que sempre se dispôs a dar-me.

À Patrícia por todos os sorrisos que me proporcionou e por toda a sua força e determinação, vontade de aprender e evoluir a cada dia como profissional, por toda a sua força e alegria de viver!

À Marta Caixinha, que com a sua sinceridade e determinação me ajudou a evoluir enquanto futura médica veterinária ao longo dos últimos 4 anos, nunca se esquecendo do que é ser uma “recém-nascida” nesse mundo. Muito mais que uma colega, sempre foi uma amiga para mim.

À Coca, por devagarinho ter entrado na minha vida e me ter apoiado em todas as alturas, melhores ou menos boas, por ser espontânea comigo, por me deixar fazer parte da sua vida e por toda a sua sinceridade. O céu é o limite!

À Bárbara, por me pôr sempre a trabalhar e me dar a confiança necessária para ultrapassar cada dia desta aprendizagem constante, por aturar todas as loucuras, por aceitar todas as brincadeiras sempre com um sorriso pronto.

À Rosinha pelas conversas, pelas pausas no trabalho, pela companhia ao fim de um dia de trabalho e pelas gargalhadas.

À Dra. Renata por me ter acolhido em Palma de Maiorca e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos de laboratório e estudantes de doutoramento pelo apoio prestado.

À Rita, não só por me ter ajudado com a recolha de casos para o presente estudo, mas principalmente porque sei que sem ela nunca teria acabado este curso. Obrigada por acreditares em mim, por lutares sempre comigo e por me deixares fazer parte da tua vida. Obrigada por me mostrares o que devo fazer para ser uma pessoa melhor a cada dia que passa. És a minha pessoa!

Ao meu Loquinhas, por me colocar um sorriso na cara sempre, por todo o apoio que sabes que me deste em cada dia do nosso percurso!

Ao Tiago, por nos fazer imaginar situações bizarras mas que nos fazem sorrir a cada palavra.

À Sofia, por me entender e saber sempre o que dizer quando preciso. Obrigada por existires.

À Catarina, por ter sido uma companheira ao longo do meu estágio, pela ajuda na recolha de casos, pelas fotografias, pela companhia nas longas tardes de faculdade e por todas as conversas!

Ao Ricardo, só por fazer parte da minha vida!

À Patrícia e à Sara, porque foram mais que amigas ao longo do meu curso, apoiando-me sempre e partilhando gargalhadas inesquecíveis comigo!

À família Cabrita, parte minha família sempre e para sempre.

À Ana, por todo o apoio que me deu quando me vi perdida e sozinha num país desconhecido.

Ao João, por me mostrar todo um mundo que existe fora do mundo da veterinária. Por me aturar e me deixar aturá-lo e apoiá-lo, por ser a pessoa mais louca que conheço e me deixar voar com ele.

Ao Daniel, por toda a companhia, apoio, por me deixar ser criança quando preciso, por tomar conta de mim, por me fazer sentir especial todos os dias, por existir!

Por último, agradeço à Dra. Vanessa por fazer ver que a minha vida faz sentido, que tudo se resolve, que nós traçamos a nossa vida e que todo o esforço e dedicação é compensado. Por me ter ajudado a ultrapassar momentos que pareciam impossíveis de superar. Por me dar esperança na vida.





## Resumo

---

### Caracterização de *Enterococcus* spp. isolados da boca e do coração de cães com doença periodontal

O presente estudo pretende verificar a possível associação entre a doença periodontal e a doença cardiovascular, avaliando a presença e diversidade de *Enterococcus* spp. na gengiva e no coração de cães com doença periodontal. Através de métodos fenotípicos e moleculares identificaram-se 117 isolados como pertencentes ao género *Enterococcus* e avaliou-se a sua diversidade pela técnica de PCR-*fingerprinting*. Selecionaram-se 46 isolados representantes, 39 identificados como *E. faecalis*, 7 como *E. faecium* e 2 permaneceram por identificar. Para estimar o potencial de patogenicidade avaliaram-se os isolados quanto à suscetibilidade a antimicrobianos e à presença de fatores de virulência. Todos os isolados mostraram resistência à clindamicina; para a tetraciclina e a gentamicina as percentagens foram acima dos 50% e para os restantes antimicrobianos mantiveram-se abaixo desse valor. Na pesquisa de fatores de virulência 43% dos isolados revelaram-se  $\beta$ -hemolíticos e 23% gelatinase positivos. Para os genes de virulência pesquisados detetaram-se percentagens acima dos 50% para *gelE*, *efaA<sub>fs</sub>*, *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* e *gls24* e abaixo desse valor para *agg*, *esp*, *efaA<sub>im</sub>*, *cylA*, *acm* e *ace*.

Não se verificou associação entre a doença periodontal e a endocardite bacteriana, mas foi possível verificar a presença de bactérias de importância clínica disseminadas pela boca e coração de cães em níveis relativamente elevados, sendo de suma importância prosseguir estudos no sentido de melhor compreender esta possível associação.

Palavras-chave: Doença periodontal, endocardite bacteriana, *Enterococcus* spp., canídeos.



## Abstract

---

### Characterization of *Enterococcus* spp. isolated from the mouth and heart of dogs with periodontal disease

The present study investigated the possible association between periodontal and cardiovascular disease, evaluating the presence and diversity of *Enterococcus* spp. in the gum and heart of dogs with periodontal disease. Phenotypic and molecular methods were used, yielding a total of 117 isolates identified as *Enterococcus* spp., evaluated for diversity by PCR-fingerprinting. 46 representative isolates were selected, 39 of which identified as *E. faecalis*, 7 as *E. faecium* and two remained unidentified. To estimate the potential pathogenicity of the isolates, they were evaluated for susceptibility to antimicrobial agents and the presence of virulence factors. All isolates showed resistance to clindamycin; for tetracycline and gentamicin percentages were above 50% and for the remaining antimicrobials remained below this value. In search of virulence factors 43% of the isolates proved to be  $\beta$ -hemolytic and 23% gelatinase positive. For the virulence genes surveyed, percentages observed were above 50% for *gelE*, *efaA<sub>fs</sub>*, *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* and *gls24* and below this value for *agg*, *esp*, *efaA<sub>im</sub>*, *cylA*, *acm* and *ace*.

It was not possible to establish an association between periodontal disease and bacterial endocarditis, but it was possible to verify the presence of bacteria of clinical importance disseminated through the mouth and heart of dogs at relatively high levels. It is extremely important to continue studies to better understand this possible association.

Keywords: periodontal disease, bacterial endocarditis, *Enterococcus* spp., canids.





## Índice

---

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	ix
Abstract .....	xi
Índice .....	xiii
Índice de figuras .....	xvi
Índice de tabelas.....	xvii
Índice de equações.....	xvii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xviii
Parte I – Descrição das atividades de estágio.....	1
1. Eurotierklinik Son Veri.....	1
2. AlcabidecheVet .....	2
3. Faculdade de Medicina Veterinária .....	4
Parte II - Revisão bibliográfica .....	6
1. Introdução .....	6
2. Doença periodontal canina.....	7
2.1. Prevalência .....	7
2.2. Fatores predisponentes.....	8
2.3. Etiologia .....	8
2.4. Patogenia da doença periodontal canina.....	10
2.5. Sinais clínicos .....	11
2.6. Fases da doença periodontal .....	11
2.7. Diagnóstico .....	14
2.7.1. Exame clínico.....	14
2.7.2. Diagnóstico radiográfico.....	14
2.8. Tratamento.....	14
2.8.1. Tratamento conservativo – profilaxia.....	15
2.8.2. Tratamento cirúrgico .....	15
2.8.3. Tratamento farmacológico.....	16
2.9. Complicações da doença periodontal.....	16
2.9.1. Alterações locais.....	16
2.9.2. Alterações sistêmicas.....	17
2.10. Prevenção e profilaxia .....	19
3. Endocardite bacteriana.....	20
3.1. Fisiopatogenia.....	21
3.2. Etiologia .....	21
3.3. Sinais clínicos .....	22
3.4. Diagnóstico .....	22

3.4.1.	Exames laboratoriais.....	23
3.4.2.	Hemocultura.....	23
3.4.3.	Diagnóstico por imagem.....	23
3.4.4.	Eletrocardiograma.....	24
3.5.	Tratamento.....	24
3.6.	Prognóstico .....	24
4.	A infecção a <i>Enterococcus</i> .....	25
4.1.	Características gerais do género <i>Enterococcus</i> .....	25
4.2.	Identificação de bactérias do género <i>Enterococcus</i> .....	26
4.3.	Potencial de patogenicidade e virulência.....	26
4.3.1.	Resistências a antimicrobianos .....	27
4.3.1.1.	Resistência intrínseca .....	28
4.3.1.2.	Resistência extrínseca.....	28
4.3.2.	Fatores de virulência .....	28
4.3.2.1.	Adesinas .....	29
4.3.2.2.	Fatores secretados.....	31
4.3.2.3.	Feromonas sexuais .....	33
4.3.2.4.	Fatores de virulência menos bem caracterizados .....	33
4.3.3.	Síndromes clínicas .....	34
4.3.4.	Infeção por <i>Enterococcus</i> spp. ....	34
Parte III – Desenvolvimento experimental.....		36
1.	Objetivos do estudo.....	36
2.	Material e métodos.....	36
2.1.	Crítérios de inclusão.....	36
2.2.	Recolha de amostras .....	36
2.3.	Processamento de amostras e isolamento de <i>Enterococcus</i> spp. ....	37
2.4.	Identificação ao nível de género.....	38
2.4.1.	Métodos fenotípicos .....	38
2.4.2.	Métodos moleculares .....	38
2.5.	Análise da diversidade .....	39
2.5.1.	Análise de dados.....	39
2.6.	Identificação ao nível da espécie.....	40
2.7.	Suscetibilidade a antimicrobianos - antibiogramas .....	41
2.8.	Fatores de virulência .....	42
2.8.1.	Testes em placa.....	42
2.8.2.	Pesquisa de genes de virulência .....	42
3.	Resultados e discussão.....	44
3.1.	Recolha de amostras .....	44
3.2.	Processamento das amostras e isolamento .....	46

3.3. Identificação ao nível de género.....	48
3.3.1. Métodos fenotípicos .....	48
3.3.2. Métodos moleculares .....	49
3.4. Análise da diversidade .....	51
3.5. Identificação ao nível da espécie.....	55
3.6. Suscetibilidade a antimicrobianos – antibiogramas .....	55
3.7. Fatores de virulência .....	58
3.7.1. Testes em placa.....	58
3.7.2. Pesquisa de genes de virulência .....	61
3.8. Relação entre a doença periodontal e a endocardite bacteriana .....	64
Parte IV – Conclusão e perspetivas futuras .....	65
Bibliografia .....	67
Anexos.....	76

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Aplicação de laser classe IV em cão de fila brasileiro de 10 anos com dor lombar, no centro de fisioterapia e reabilitação da clínica veterinária <i>Eurotierklinik Son Veri</i> .....	1
<b>Figura 2.</b> Extirpação de mixossarcoma na região lombossagrada de cão de raça labrador de 12 anos.....	3
<b>Figura 3.</b> Persistência de dentes decíduos em cão, com deposição de resíduos. ....	8
<b>Figura 4.</b> Colônias características do género <i>Enterococcus</i> provenientes das amostras EZC30 (à esquerda) e EZB30 (à direita).....	47
<b>Figura 5.</b> Primeira (A) e segunda (B) purificação das amostras EZB23 (à esquerda da figura A e B) e EZC23 (à direita da figura A e B). ....	48
<b>Figura 6.</b> Crescimento de isolados em bÍlis esculina azida agar.....	49
<b>Figura 7.</b> Coloração Gram da amostra EZB8a (ampliação 1000X).....	49
<b>Figura 8.</b> Ent-PCR das amostras 1 a 8.....	50
<b>Figura 9.</b> Dendrograma baseado nos perfis de PCR- <i>fingerprinting</i> obtidos para os enterococos em estudo, construído utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. ....	54
<b>Figura 10.</b> Perfil de resistência a antimicrobianos usados em medicina veterinária observado nos 46 isolados de <i>Enterococcus</i> representantes da coleção em estudo. ....	56
<b>Figura 11.</b> Perfil de resistência a antimicrobianos usados em medicina humana observado nos 46 isolados de <i>Enterococcus</i> representantes da coleção em estudo. ....	56
<b>Figura 12.</b> Teste de fatores de virulência em placa – hemólise. ....	60
<b>Figura 13.</b> Teste de fatores de virulência em placa – gelatinase. ....	61
<b>Figura 14.</b> Genes de virulência pesquisados nos 46 isolados de enterococos representantes da coleção em estudo.....	62
<b>Figura 15.</b> Prevalência relativa ao género dos animais em estudo.....	77
<b>Figura 16.</b> Prevalência relativa à idade dos animais em estudo. ....	77
<b>Figura 17.</b> Prevalência relativa à raça dos animais em estudo.....	78
<b>Figura 18.</b> Prevalência relativa ao porte dos animais em estudo.....	78
<b>Figura 19.</b> Prevalência relativa ao estadio de doença periodontal dos animais em estudo.....	79
<b>Figura 20.</b> Prevalência relativa à ocorrência de destartarização em vida nos animais em estudo.....	79

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Intervenções cirúrgicas praticadas pela autora durante o período de estágio na clínica veterinária <i>AlcabidecheVet</i> . ....	3
<b>Tabela 2.</b> Caracterização das diferentes fases da doença periodontal. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Compostos antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade a antimicrobianos, respetivos alvos e classes. ....	41
<b>Tabela 4.</b> Combinações de PCR <i>multiplex</i> usadas para determinar os fatores de virulência. ....	43
<b>Tabela 5.</b> Identificação e dados relevantes de cada indivíduo da amostragem. ....	45
<b>Tabela 6.</b> Resultados dos testes em placa para pesquisa de fatores de virulência (hemólise e gelatinase). ....	59
<b>Tabela 7.</b> Limites dos diâmetros estabelecidos pelo CLSI (2013) para medicina veterinária e para medicina humana, para os antimicrobianos testados no presente estudo. ....	76
<b>Tabela 8.</b> Probabilidade de associação entre o género, a idade, a raça, o porte e a ocorrência de destartarização em vida e o estadio de doença periodontal. ....	80
<b>Tabela 9.</b> Probabilidade de associação entre tecido de isolamento e o perfil de resistências a antimicorbianos dos isolados em estudo. ....	81
<b>Tabela 10.</b> Probabilidade de associação entre tecido de isolamento e os genes de virulência pesquisados nos isolados em estudo. ....	82

## Índice de equações

---

<b>Equação 1.</b> Índice de diversidade de Simpson. ....	40
<b>Equação 2.</b> Índice de diversidade de Shannon. ....	40
<b>Equação 3.</b> Derivado do índice de Shannon. ....	40

## Lista de abreviaturas e símbolos

---

μL – Microlitro;  
μM – Micromolar;  
Ace – Adesina de ligação ao colagénio da espécie *E. faecalis*;  
ace – Gene que codifica a proteína Ace;  
Acm - Adesina de ligação ao colagénio da espécie *E. faecium*;  
acm – Gene que codifica a proteína Acm;  
agg – gene que codifica a substância de agregação de enterococos;  
Alfa-SMA – *Alpha Smooth Muscle Actin*;  
ALT – Alanina aminotransferase;  
AMC – Amoxicilina + Ácido clavulânico;  
AMP – Ampicilina;  
BHI – *Brain Heart Infusion*;  
Bop – *Biofilm on plastic*;  
C – Cloranfenicol;  
CIP – Ciprofloxacina;  
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*;  
CN – Gentamicina;  
cyl – Gene que codifica a hemolisina;  
D – Índice de diversidade de Simpson;  
DA – Clindamicina;  
DNA – Ácido desoxirribonucleico;  
DNase – Desoxirribonuclease;  
E – Eritromicina;  
ebp – Gene que codifica a proteína Ebp;  
Ebp – Fímbrias associadas a endocardite/formação de biofilme pela espécie *E. faecalis*;  
EfaA – Adesina da parede celular de *Enterococcus*;  
efa<sub>Afm</sub> – Gene da espécie *E. faecium* que codifica a proteína EfaA;  
efa<sub>Afs</sub> – Gene da espécie *E. faecalis* que codifica a proteína EfaA;  
ElrA – *Enterococcal leucine-rich protein A*;  
Epa – Antígeno polissacarídico de enterococos;  
esp – gene que codifica a proteína Esp;  
Esp – Proteína de superfície de *Enterococcus*;  
EZB – *Enterococcus* zaragatoa boca;  
EZC – *Enterococcus* zaragatoa coração;  
FAZ – Fosfatase alcalina sérica;  
FeLV – Vírus da leucemia felina;

FIV – Vírus da imunodeficiência felina;  
*gelE* – Gene que codifica a gelatinase;  
GGT – Gama glutamil transferase;  
*gls24* – Gene que codifica a proteína GlS24;  
GlS24 – Proteína reguladora de resposta ao *stress* da espécie *E. faecalis*;  
H' – Índice de diversidade de Simpson;  
IACS – Infecções associadas aos cuidados de saúde;  
Ig – Imunoglobulina;  
IL – Interleucina;  
IM – Intramuscular;  
IMP – Imipenem;  
ISO – Organização Internacional para Padronização;  
IV – Endovenoso;  
LPS – Lipopolissacárido;  
MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária;  
mL – Mililitro;  
mm – Milímetro;  
mM – Milimol;  
MSCRAMM - *Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*;  
°C – Graus Celsius;  
OMV – Ordem dos Médicos Veterinários;  
p – Probabilidade;  
PCR – *Polymerase chain reaction*;  
PG – Prostaglandina;  
pH – Potencial hidrogeniônico;  
PO – *Per os*;  
*qnr* - Gene de resistência às quinolonas transmitido por plasmídeos;  
rpm – Rotações por minuto;  
rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal;  
SA – Substância de agregação;  
SBA – *Slanetz and Bartley Agar*;  
SC – Subcutâneo;  
spp. – Espécies;  
*sprE* – Gene que codifica a endopeptidase da serina;  
SRD – Sem raça definida;  
TBE – Tris-borato-EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético);  
TE – Tetraciclina;  
TNF – Fator de necrose tumoral;



TTC – Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio;

UFC – Unidades formadoras de colónias;

UPGMA – Método de aglomeração pela média aritmética não ponderada;

V – Volt;

v/v – Percentagem de volume;

VA – Vancomicina.

## Parte I – Descrição das atividades de estágio

---

No último ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, a autora fez um estágio de cerca de 5 meses em dois locais distintos – na clínica veterinária *Eurotierlinik Son Veri*, em Palma de Maiorca, Espanha, de 1 a 30 de setembro de 2013; e na clínica veterinária *AlcabidecheVet*, em Lisboa, Portugal, de 9 de outubro de 2013 a 31 de janeiro de 2014.

O estágio foi supervisionado pela Dra. Cláudia Margarida Palmela Beato Godinho Correia de Oliveira Miguel (*AlcabidecheVet*) e co-orientado pela Professora Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa).

### 1. *Eurotierlinik Son Veri*

Durante a primeira parte do estágio, em Palma de Maiorca, com um total de 125 horas (cerca de 35,5 horas semanais) a estudante seguiu as atividades diárias do centro de fisioterapia e reabilitação da clínica veterinária *Eurotierlinik Son Veri*, adquirindo conhecimento nessa área, principalmente na fisioterapia e reabilitação canina. Nesse mês a estudante foi iniciada nas principais técnicas realizadas no centro, com o acompanhamento da Dra. Renata Diniz, especialista em reabilitação e fisioterapia veterinária, com o Certified Canine Rehabilitation Practitioner do Tennessee. Foi possível observar o processo de diagnóstico e tratamento e inclusivamente realizar técnicas como hidroterapia, laserterapia (Figura 1), fototerapia, eletroterapia, ultrassonografia e magnetoterapia em animais de desporto, geriátricos, em melhoria de condição corporal, pacientes ortopédicos e neurológicos, com patologia diversa, como displasia de anca e cotovelo, hérnias discais, discoespondilose, contraturas musculares, síndrome da cauda equina, entre outros.

Este mês cultivou na autora uma curiosidade profunda em relação a esta área, sendo seu desejo continuar a aprender e observar atividades relacionadas.

**Figura 1.** Aplicação de laser classe IV em cão de fila brasileiro de 10 anos com dor lombar, no centro de fisioterapia e reabilitação da clínica veterinária *Eurotierlinik Son Veri* (imagem gentilmente cedida por Dra. Renata Diniz).



## 2. *AlcabidecheVet*

O estágio na clínica veterinária *AlcabidecheVet* surgiu como continuação do estágio voluntário realizado na mesma desde o 2º ano do MIMV. Por opção da estudante e com o consentimento das orientadoras, foi desenvolvida uma atividade média de 10 horas diárias de terça a sexta, e 4 horas aos domingos, perfazendo um total de 770 horas de prática médico-veterinária.

A clínica veterinária *AlcabidecheVet* possui uma equipa constituída por cinco médicos veterinários, duas enfermeiras veterinárias e uma auxiliar, encontrando-se num espaço construído de raiz para a prática de medicina veterinária, composto pela receção e sala de espera, dois consultórios, sala de imagem e análises clínicas com aparelho radiográfico, ecógrafo, equipamento para análises bioquímicas e hemograma, microscópio e eletrocardiógrafo, sala pré-operatória e bloco operatório e ainda uma sala de internamento com jaulas de dimensões variadas, permitindo internar em simultâneo cães, gatos e animais exóticos. A clínica dispõe ainda de um escritório com uma pequena biblioteca e acesso à internet, uma loja com produtos variados para os animais domésticos e uma sala de tosquiadas. A estudante teve a possibilidade de acompanhar casos clínicos nas áreas de medicina interna, cirurgia e internamento de animais de companhia e de animais exóticos.

Na área da medicina interna de animais de companhia a estudante teve a oportunidade de realizar anamneses e exames físicos, vacinações, desparasitações internas e externas e aplicação de *microchips*. Teve ainda a possibilidade de proceder à administração de fármacos por diversas vias (endovenosa, intramuscular, subcutânea, *per os*), adquirindo assim uma familiarização com protocolos terapêuticos, nomes dos diversos medicamentos e respetivas apresentações. Além disso, outras atividades foram desenvolvidas nesta área, como a aplicação e mudança de pensos (familiarização com as utilizações específicas de cada tipo), venopunções para colheita de sangue, colocação de cateteres, realização de algaliações e clisteres, participação em transfusões sanguíneas, tanto na parte da colheita, como no ato transfusional. Durante cada procedimento, era realizada uma discussão do diagnóstico com o médico responsável por cada caso e ao final de cada dia a aluna fez o acompanhamento e participação na discussão de casos clínicos que a equipa médica realiza diariamente. Na área da medicina interna de animais exóticos houve a possibilidade de acompanhar o Dr. Rui Patrício, especialista em animais exóticos, na realização de vacinação de coelhos e furões, corte de unhas de furões e cobaias, drenagem de abscessos em hamsters, tratamentos de feridas em aves, recuperação de dragão barbudo com anorexia, entre outros. Uma vez que a clínica veterinária dispõe de serviço de urgências 24 horas, a estudante pôde ainda fazer a receção, triagem e estabilização de pacientes politraumatizados, intoxicados, em choque cardiogénico ou hipovolémico, golpe de calor, entre outras situações.

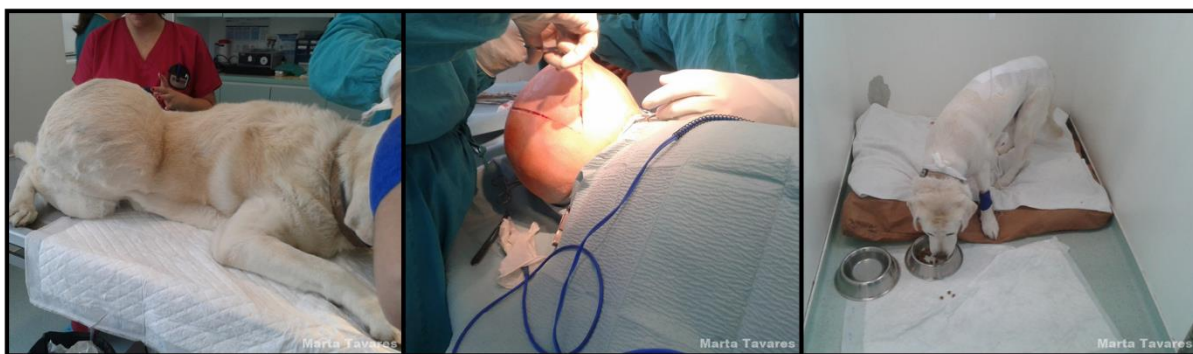
Na área do internamento de animais de companhia e animais exóticos a aluna fez a monitorização dos animais, administração de fármacos por diversas vias (IV, IM, SC, PO), bem como a prestação de cuidados de alimentação e higiene.

Na área da cirurgia, foi praticada não só a preparação do paciente e do campo operatório, mas também funções de anestesista (indução e manutenção anestésicas) e ajudante de cirurgião em cirurgias de tecidos moles e ortopédicas (Tabela 1). Foi igualmente feito o acompanhamento dos animais durante o período pós-operatório (recobro e consultas de seguimento para avaliação da cicatrização, mudança de penso e remoção de suturas).

**Tabela 1.** Intervenções cirúrgicas praticadas pela autora durante o período de estágio na clínica veterinária *AlcabidecheVet*.

	Intervenção cirúrgica	Número			
		Cão	Gato	Coelho	Total
Ajudante de cirurgião	Ovariohisterectomia	16	4	-	20
	Extirpação de quistos/massas/nódulos (Figura 2)	13	1	-	14
	Destartarização	11	1	-	12
	Castração	4	2	-	6
	Cistotomia	2	-	-	2
	Desgaste de dentes	-	-	2	2
	Amigdalectomia	1	-	-	1
	Amputação de cauda por mordedura de cobra	1	-	-	1
	Extração de pinos cruzados no joelho	1	-	-	1
	Traqueostomia	1	-	-	1
	Laparotomia exploratória de emergência	1	-	-	1
	Gastropexia	1	-	-	1
	Cesariana	2	-	-	2
Anestesista	Trocleoplastia (correção de luxação da rótula)	2	1	-	3
	Estabilização extra-articular-retinacular lateral (rotura do ligamento cruzado anterior)	1	-	-	1
	Laparotomia exploratória de emergência	1	-	-	1
Total de intervenções cirúrgicas assistidas					69

**Figura 2.** Extirpação de mixossarcoma na região lombossagrada de cão de raça labrador de 12 anos (fotografias originais).



Como exames complementares de diagnóstico de apoio à consulta externa, ao internamento e à cirurgia foram realizados e discutidos os resultados de otoscopias (cão), radiografias simples e de contraste (cão, gato e coelho), ecografias (cão e gato), eletrocardiogramas (cão) e ecocardiografias (coelho e cão). A aluna executou e interpretou os resultados de análises de urina, hematológicas e bioquímicas sanguíneas, testes rápidos de leishmaniose, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) e observação microscópica de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemoparasitas (microfilárias e micoplasma), sedimento urinário, raspagens cutâneas para pesquisa de ácaros e citologias cutâneas e vaginais.

Foi ainda possível à aluna assistir a metodologias mais recentes nesta clínica como a prática de acupuntura e fisioterapia como adjuvante da terapêutica convencional para tratamento da dor crónica em pacientes geriátricos, recuperação de cirurgias ortopédicas, entre outros.

Procedeu-se ainda à apresentação semanal de um trabalho escrito sobre um tema à escolha da equipa da *Alcabideche Vet*, posteriormente corrigido e discutido, por forma a enriquecer os conhecimentos da aluna. Foi também realizado um *poster* para apresentação nas XXXVII Jornadas Médico-Veterinárias AEFMV 2013, sobre um caso clínico acompanhado durante o estágio. A aluna realizou ainda uma revisão bibliográfica para participação no Prémio Bayer Saúde Animal 2013, na área dos animais de companhia, sobre o tema “Antibioterapia nas piodermatites dos animais de companhia”, o qual foi efetivamente ganho.

No decorrer da atividade prática e com o intuito de realizar esta dissertação, a aluna procedeu à necrópsia de canídeos adultos, com colheita de órgãos (coração) desses mesmos animais, bem como realização de zaragatoas desse órgão e da boca. Estas amostras foram posteriormente processadas e analisadas no laboratório de bacteriologia da FMV – ULisboa. Durante o restante período de tempo, a estudante trabalhou nesta dissertação, supervisionada pelos orientadores e pelos restantes membros da equipa.

### 3. Faculdade de Medicina Veterinária

Como complemento ao estágio curricular e por forma a proceder ao estudo que está na base desta dissertação, a aluna realizou ainda um total de 415 horas na FMV – ULisboa, entre janeiro e maio, na área de microbiologia, sob a supervisão da Doutora Manuela Oliveira e da

Doutora Teresa Semedo. A aluna realizou diversas técnicas, nomeadamente culturas bacterianas, métodos fenotípicos de identificação bacteriana (hidrólise da esculina, coloração gram, testes de oxidase e catalase), *polymerase chain reaction* (PCR) e eletroforese em gel de agarose.

### 1. Introdução

Com base nos estudos feitos em medicina humana, os médicos veterinários aconselham os donos a ter um cuidado diário assíduo com a cavidade oral dos seus animais de estimação, nomeadamente de cães e gatos. Esta recomendação baseia-se no facto de, à semelhança do que acontece no Homem, a doença periodontal poder estar na origem de doenças sistémicas graves causadas por bactérias presentes na cavidade bucal, que podem até pôr em risco a vida dos animais domésticos, nomeadamente doenças cardiovasculares (infarto do miocárdio e aterosclerose, por exemplo). Apesar desta postura adotada pelos médicos veterinários, não existem estudos que provem claramente esta relação entre a doença periodontal e doenças sistémicas em animais domésticos (Pavlica et al., 2008).

Vários estudos têm vindo a ser feitos neste sentido. Assim, em 1996, DeBowes et al. avaliaram a presença e extensão da doença periodontal em 45 cães, tendo realizado análise histopatológica do pulmão, miocárdio, fígado, rins, tonsilas, baço, linfonodos submandibulares e traqueobrônquicos. Foi estabelecida associação entre a doença periodontal e as alterações histopatológicas observadas nos rins, miocárdio e fígado (DeBowes et al., 1996). Pavlica et al. (2008) fizeram uma investigação *post mortem* a 44 caniches miniatura, que incluiu uma avaliação da cavidade oral, necrópsia e histopatologia dos órgãos internos, tendo sido estabelecida uma ligação entre o grau de doença periodontal e o grau de envolvimento sistémico, indicando um possível contributo da doença periodontal para o desenvolvimento de patologias em órgãos distantes. Em 2009, Peddle, Drobatz, Harvey, Adams e Sleeper realizaram um estudo retrospectivo com 76 cães, com endocardite, para identificar os fatores de risco da endocardite bacteriana, procurando determinar se a doença periodontal e os procedimentos cirúrgicos estavam associados à endocardite bacteriana, não tendo obtido nenhuma evidência nesse sentido (Peddle et al., 2009).

A endocardite bacteriana é um processo inflamatório do endocárdio, causado geralmente por bactérias que aderem às válvulas e à parede do miocárdio (Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011; Velkers et al., 2011). Na espécie canina tem baixa prevalência (Cavaguchi et al., 2010), mas mau prognóstico, uma vez que resulta em lesões em diversos órgãos (Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011). As bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* são um dos agentes que pode estar na origem desta doença, sendo responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) cada vez mais frequentes, tanto em pacientes humanos como em animais de companhia (Semedo-Lemsaddek, Barreto-Crespo, & Tenreiro, 2012). As bactérias do género *Enterococcus* possuem um conjunto de características que as torna potencialmente patogénicas e que, juntamente com o perfil de multirresistência a antimicrobianos que apresentam frequentemente, contribuem para que sejam uma fonte de preocupação no que diz respeito à saúde pública (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Assim,

além da importância para a saúde animal, como parte integrante na responsabilidade pela saúde pública, os médicos veterinários devem estar informados acerca dos riscos que podem estar na origem da negligência da saúde oral dos mesmos. De facto, a crescente aproximação das pessoas aos seus animais de estimação leva a que ocorram frequentemente acidentes, como mordeduras, através das quais podem ser veiculados microrganismos zoonóticos.

## 2. Doença periodontal canina

A doença periodontal é das infeções mais frequentes nos cães e no Homem (Penman & Harvey, 1992; Debowes et al., 1996; Niemiec, 2008; Pavlica et al., 2008), sendo um termo generalista aplicado às lesões inflamatórias induzidas pela presença de placa dentária que afetam o periodonto (Penman & Harvey, 1992; Debowes et al., 1996). Pode então definir-se a doença periodontal como uma infeção da gengiva, seguida frequentemente pela destruição dos tecidos periodontais, causada por bactérias constituintes da placa dentária acumuladas na superfície dos dentes (Novak, 2006; Niemiec, 2008; Pavlica et al., 2008).

Hoje em dia há uma preocupação crescente com a odontologia veterinária, na medida em que os proprietários procuram cada vez mais preservar a saúde oral dos seus animais de estimação. Estes cuidados, associados a uma nutrição cuidada, contribuem para prolongar a esperança média de vida de todos os animais (Crossley, 2005; Pavlica et al., 2008).

Em contraste com os médicos dentistas e os higienistas orais de medicina humana, que se podem especializar nesta área, dedicando muito tempo à aprendizagem de metodologias de limpeza subgengival, a experiência dos médicos veterinários neste âmbito é diminuta. Muitos fatores contribuem para esta situação, tais como a falta de treino profissional, a falta de instrumentos adequados e o desconhecimento da anatomia dos dentes dos diferentes animais (Crossley, 2005).

Atualmente, as doenças orais do cão representam tanto um desafio, como um campo de interesse económico importante para os veterinários. Reconhece-se assim a necessidade de examinar a cavidade oral, durante o exame clínico geral do animal.

### 2.1. Prevalência

A doença periodontal afeta a maioria dos canídeos domésticos no decorrer da sua vida (Hennet, 2006). Por volta dos 2 anos de idade, 70% dos gatos e 80% dos cães já terão algum grau de doença periodontal (Pennman & Harvey, 1992; Wiggs & Lobprise, 1997; Niemiec, 2008). No entanto, apesar da percentagem elevada de animais com esta doença, ela é na maioria das vezes desprezada, na medida em que raramente constitui um estímulo iatrotrópico (Lund et al., 1999).

Num estudo levado a cabo por Kyllar e Witter (2005), foram encontradas afeções orais em 348 dos 408 cães que se apresentaram à consulta. As afeções mais frequentes foram a deposição de cálculo (61,3%), a periodontite (60,0%), a perda de dentes (33,8%) e o desgaste



dentário anormal (5,9%). Foram ainda observados casos mais raros de cárie dentária, de tumores e de hipoplasia do esmalte (Kyllar & Witter, 2005). Segundo um estudo realizado por Lund e colaboradores, em clínicas privadas nos Estados Unidos, as alterações clínicas mais comuns, tanto em cães como em gatos, são o cálculo dentário (20,5%) e a presença de gengivite (19,5%) (Lund, Armstrong, Kirk, Kolar, & Klausner, 1999).

## 2.2. Fatores predisponentes

São muitos os fatores que contribuem para a prevalência e gravidade da doença periodontal (Pavlica et al., 2008). Um dos fatores mais relevantes são as anomalias anatômicas. A placa dentária tende a acumular-se mais precocemente em dentes sobrepostos devido a alterações da maxila ou da mandíbula, como o prognatismo e o braquignatismo, frequente nas raças miniatura, ou com superfícies irregulares, devido a hipoplasia do esmalte e fraturas (Hoskins, 2004; Pavlica et al., 2008). A persistência de dentes decíduos também predispõe à deposição da placa dentária (Figura 3), por aumento da área de retenção de placa bacteriana levando assim a problemas periodontais (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012; Holmstrom et al., 2013). É de suma importância uma avaliação cuidadosa da cavidade oral em qualquer fase da vida dos cães, já que em raças miniaturas podem começar a surgir sinais de doença periodontal a partir dos 9 meses de idade (Holmstrom et al., 2013).

**Figura 3.** Persistência de dentes decíduos em cão, com deposição de resíduos (fotografia original).



## 2.3. Etiologia

A cavidade oral fornece um ambiente ideal para a multiplicação de uma ampla variedade de espécies de bactérias de Gram positivo, principalmente aeróbias. Estas bactérias estão sempre presentes na cavidade bucal de animais saudáveis e o sistema imunitário reage ligeiramente contra elas, uma vez que a maior parte são comensais. Por outro lado, as

superfícies dos dentes são relativamente irregulares, permitindo a adesão e acumulação de bactérias. Se os mecanismos de defesa naturais, tais como a presença de imunoglobulina A (IgA) salivar, lisozima e lactoperoxidase, não forem suficientes para controlar o número de bactérias, este pode aumentar para níveis que induzem uma resposta inflamatória marcada (Crossley, 2005). A doença periodontal inicia-se quando bactérias da cavidade bucal aderem e se acumulam nos dentes, formando uma substância denominada placa dentária. A placa é um biofilme<sup>1</sup> composto essencialmente por bactérias da cavidade bucal contidas numa matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar (Wiggs & Lobprise, 1997; Crossley, 2005; Quirynen, Teughels, Kinder, & Newman, 2006; Niemiec, 2008; Albuquerque, et al., 2011; Whyte, et al., 2014). Os biofilmes permitem a colonização por novas espécies de bactérias, incluindo uma ampla gama de espécies bacterianas de Gram negativo e espiroquetas patogénicas, que estimulam uma resposta inflamatória mais acentuada (Crossley, 2005). A placa presente na superfície dos dentes denomina-se de supragengival, mas uma vez que esta se estende para baixo da margem gengival livre (sulco gengival), ficando localizada entre a gengiva e o osso alveolar, passa a designar-se placa subgengival (Harvey & Emily, 1993; Quirynen et al., 2006; Niemiec, 2008).

À medida que se desenvolve um processo inflamatório, causado por um aumento na concentração e na diversidade de bactérias, surge a gengivite na qual a placa dentária prolifera subgengivalmente. No início a placa dentária é constituída predominantemente por bactérias aeróbias que, ao consumirem oxigénio, levam à diminuição do potencial redox, tornando o ambiente mais propício ao crescimento das espécies anaeróbias, de Gram negativo, filamentosas e com mobilidade (Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Niemiec, 2008). As bactérias anaeróbias são as responsáveis pelas alterações patológicas que conduzem à destruição e perda da força de união periodontal (Gioso, 2007). A incidência de bactérias anaeróbias aumenta de 25%, num animal saudável, para 90%, num animal com doença periodontal (Niemiec, 2008), mantendo-se contudo a quantidade de bactérias aeróbias (Wiggs & Lobprise, 1997).

A microbiota subgengival associada à periodontite canina consiste essencialmente em *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp. (Harvey & Emily, 1993; Albuquerque, et al., 2011), sendo que determinadas espécies bacterianas específicas do biofilme subgengival demonstraram maior relevância etiológica na iniciação e progressão da periodontite, entre elas, *Porphyromonas gulae*, *P. salivosa* e *P. denticanis* (Hardham, et al., 2005).

---

<sup>1</sup> Comunidades complexas e estruturadas de microrganismos rodeadas por matrizes poliméricas produzidas por elas próprias. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície húmida, seja ela biótica ou abiótica. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis. As bactérias são ubíquitas, logo, os biofilmes podem formar-se potencialmente em qualquer superfície e em qualquer ambiente (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

À medida que a inflamação progride, os produtos inflamatórios e os metabolitos tornam-se parte do fluido gengival, o que permite o crescimento de microrganismos com necessidades muito específicas como as espiroquetas, nomeadamente *Prevotella* spp. As espiroquetas possuem enzimas e outros fatores de virulência que contribuem para a progressão e agravamento da doença periodontal (Niemic, 2008).

O cálculo dentário é essencialmente composto por placa dentária calcificada devido à acumulação de bactérias mortas e consequente precipitação dos minerais presentes na saliva, como o carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio. Só por si o cálculo é inerte, mas uma vez que tem uma superfície irregular que protege a placa dentária, impede a sua remoção eficiente, levando a que o processo inflamatório persista mesmo com escovagem dos dentes (Crossley, 2005; Niemic, 2008).

#### 2.4. Patogenia da doença periodontal canina

As bactérias presentes na placa bacteriana têm influência direta na patogenia da doença periodontal, uma vez que dão origem a uma resposta inflamatória (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012). Os lipopolissacáridos (LPS) das bactérias de Gram negativo e outros produtos dos microrganismos patogénicos periodontais, como as citotoxinas e produtos do seu metabolismo, ativam os monócitos, fibroblastos e as células endoteliais e epiteliais, que libertam citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação local (Wiggs & Lobprise, 1997; Niemic, 2008; Pavlica et al., 2008).

A resposta do periodonto à reação inflamatória leva à sua destruição progressiva, iniciando-se uma gengivite, o estadio mais precoce da doença periodontal, que ocorre quando a placa dentária se acumula na coroa, adjacente ao bordo gengival (gengivite marginal). No caso de não ser removida, a placa progride subgengivalmente, resultando em inflamação gengival. Nesse caso ocorre a denominada gengivite crónica que, se não tratada, evolui, levando a quebra da junção epitelial do dente e retração gengival com migração apical do epitélio juncional. Numa fase bastante avançada, ocorre formação de bolsas periodontais que podem ter uma profundidade superior a 4 mm (Harvey & Emily, 1993; Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Carranza & Takei, 2006; Niemic, 2008). Este estadio é caracterizado por perda do tecido conjuntivo e da união óssea, resultando em periodontite grave com aumento da mobilidade dentária e eventual perda de dentes (Hoskins, 2004).

Devido ao aumento da permeabilidade vascular e ao aumento do espaço entre as células epiteliais das fendas gengivais, os leucócitos e outros mediadores inflamatórios migram para fora dos tecidos moles periodontais para o espaço periodontal. Os leucócitos combatem a infeção por fagocitose das bactérias e libertação de enzimas, nomeadamente mieloperoxidase e lisozimas libertadas pelos neutrófilos (Niemic, 2008). Quando libertadas para o sulco gengival, estas enzimas causam inflamação dos tecidos gengivais e periodontais, levando a lesão dos tecidos moles e a uma atividade osteoclástica que diminui o suporte ósseo que, no

último estadio da doença conduz a perda dentária. Pode então afirmar-se que a progressão da doença periodontal é determinada pela virulência das bactérias em combinação com a resposta imunitária do hospedeiro, uma vez que muitas vezes é esta resposta que leva à destruição dos tecidos periodontais (Harvey & Emily, 1993; Wiggs & Lobprise, 1997; Novak, 2006; Niemiec, 2008).

## 2.5. Sinais clínicos

Para identificar alterações é necessário conhecer as características normais da cavidade bucal. A gengiva saudável tem uma cor rosada com um bordo fino e textura macia e regular. Além disso, não deve existir placa nem cálculos dentários nos dentes e o sulco gengival normal nos cães tem entre 0 a 3 mm de profundidade (Wiggs & Lobprise, 1997; Niemiec, 2008).

Os sinais mais indicativos de doença da cavidade oral são halitose, alterações no padrão de alimentação, disfagia, alterações comportamentais, como isolamento ou agressividade, ptialismo, saliva com vestígios de sangue, fricção da face em objetos, corrimento nasal, espirros, assimetria da face, perda de gengiva e osso e fístulas oro-nasais (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012; Holmstrom et al., 2013). Os sinais mais frequentes, observados em cães com doença periodontal avançada, são dor oral, mal-estar geral, diminuição da condição corporal e diminuição da atividade (Hoskins, 2004; Holmstrom et al., 2013). O impacto que a doença periodontal grave tem num cão pode não ser visível até que se notem melhorias do mesmo após tratamento. Muitos donos ainda desconhecem que esta doença pode causar sinais sistémicos e atribuem as alterações de atitude e comportamento à idade avançada (Hoskins, 2004).

Em termos de exame físico, a inflamação inicial resulta em edema e eritema na margem gengival. Se a inflamação persistir, ou se existirem fatores predisponentes locais, ocorre destruição tecidual. Existem dois padrões básicos, que podem ocorrer individualmente ou em simultâneo, a recessão gengival e a formação de bolsa periodontal. Essa ocorrência fornece às bactérias uma maior superfície de fixação no dente, promovendo uma maior probabilidade de colonização por novas espécies. Com a inflamação constante acaba por ocorrer reabsorção óssea e a destruição do tecido irá continuar em redor da raiz do dente, resultando no aumento da mobilidade dentária (Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Niemiec, 2008). Em casos mais graves pode ocorrer hemorragia grave dos sulcos gengivais, fratura mandibular patológica, úlceras de contacto, migração intranasal de dentes e osteomielite (Hoskins, 2004; Niemiec, 2008).






## 2.6. Fases da doença periodontal

Mesmo em gengivas saudáveis que não apresentem sinais de doença periodontal, a placa desenvolve-se no sulco gengival. Se essa placa não for removida acaba por ocorrer gengivite,

a primeira fase da doença periodontal, que progride ao longo de 2 a 5 anos até que ocorre perda dentária. Apesar desta evolução normal, os animais imunodeprimidos ou com infecções secundárias a traumatismos provocados pela penetração de ossos ou madeira podem ter uma evolução marcadamente mais rápida da doença periodontal (Harvey & Emily, 1993; Hoskins, 2004). No caso de não existir um cuidado acrescido da parte dos donos, através da escovagem dos dentes e de destartarização anual, a doença periodontal evolui para a segunda fase, devido à marcada inflamação presente. A partir desta fase, e caso os donos sejam negligentes, o dano torna-se permanente e começa a ocorrer recessão gengival como consequência da gengivite crónica presente (Harvey & Emily, 1993; Hoskins, 2004; Merin, 2006; Niemiec, 2008).

A doença periodontal pode ser dividida em fases conforme a sua gravidade. Segundo Harvey & Emily (1993) a doença periodontal pode ser classificada em 4 fases: gengivite, periodontite ligeira, periodontite moderada e periodontite grave. Esta classificação é feita com base em diversos parâmetros, nomeadamente a evidência e extensão da destruição óssea, a presença de hiperplasia ou retração gengival, o compromisso do ligamento periodontal e a profundidade da bolsa periodontal (Harvey & Emily, 1993; Hoskins, 2004; Holmstrom, 2005; Pavlica et al., 2008). Tendo como base estes parâmetros, as diferentes fases da doença periodontal estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização das diferentes fases da doença periodontal.

	Gengiva saudável	Gengivite	Periodontite ligeira	Periodontite moderada	Periodontite grave
Aspeto macroscópico	Gengiva rosada ou pigmentada segundo a coloração do animal. O tecido gengival apresenta-se firme e resistente, com contorno bem definido	Gengiva apresenta inflamação, eritema e pode apresentar sangramento	Gengiva semelhante àquela que apresenta gengivite. Começa a notar-se deposição de cálculo dentário e a retração ou hiperplasia gengival	Aumenta a inflamação e a deposição de cálculo dentário, com exposição de furca* evidente nos dentes multirradiculares	Inflamação grave da gengiva com retração gengival. Culmina com a exfoliação dos dentes.
Perda óssea	0 %	0 %	<25 %	30 – 50 %	>50 %
Deposição de cálculo dentário					
Sulco gengival	<1 – 2 mm	<1 – 2 mm	Até 5 mm	Até 7 mm	>7 mm
Prognóstico	-	Reversível	Irreversível	Irreversível	Irreversível

\*Zona do osso que divide as raízes mesiais e distais dos dentes molares.

## 2.7. Diagnóstico

### 2.7.1. Exame clínico

Quando os sinais clínicos sugerem doença da cavidade oral, deve ser efetuada uma observação detalhada da mesma. O exame físico deve incluir a visualização dos lábios, vestíbulo da boca, dentes, gengiva, palato duro e mole, tonsilas, tecido sublingual, língua e ainda olhos e nariz. Deve ainda incluir-se a palpação externa da mandíbula, maxila e linfonodos locais (Hoskins, 2004; Holmstrom et al., 2013).

Devem retrair-se os lábios e manter a boca fechada para permitir a inspeção da superfície labial e bucal dos dentes e para identificar o padrão de oclusão dentária. O vestíbulo da boca pode ser examinado usando um dedo. Após estes procedimentos abre-se então a boca e examinam-se as faces lingual e palatina dos dentes, seguindo-se a observação do palato mole e duro, língua, tecido sublingual e tonsilas (Hoskins, 2004; Holmstrom et al., 2013).

### 2.7.2. Diagnóstico radiográfico

A radiografia dentária permite verificar a extensão da doença periodontal e auxiliar na elaboração do plano terapêutico (Hoskins, 2004). Em 1998, Verstraete, Kass, & Terpak estudaram a importância da radiografia intraoral, tendo diagnosticado doença relevante em 27,8% dos cães e 41,7% dos gatos avaliados, que não apresentavam sinais de doença oral no exame inicial. Em 50% dos cães e em 53,9% dos gatos com sinais clínicos no exame inicial, foi observada doença oral adicional após exame radiográfico (Verstraete et al., 1998). Os sinais radiográficos comuns na doença periodontal incluem arredondamento da crista óssea alveolar na junção com o cimento, aumento da largura do espaço periodontal, perda da integridade da lâmina dura, alterações no osso alveolar (aumento ou diminuição da densidade óssea) e perda da crista óssea alveolar. A perda óssea horizontal é a causa mais comum de perda de osso alveolar, sendo que pode também ocorrer perda vertical, que resulta em bolsas intraósseas (Hoskins, 2004).

## 2.8. Tratamento

O tratamento deve aliviar a dor oral e repor o aspeto normal da cavidade oral. Ao decidir a abordagem terapêutica a aplicar, e tendo em conta que a doença periodontal afeta principalmente animais idosos, é necessário ponderar fatores como o risco anestésico *versus* o benefício do procedimento dentário necessário e o compromisso e disponibilidade dos donos para a realização de tratamentos dentários regulares em casos graves e de manutenção diária em casa. Contudo o carácter do animal também deve ser considerado. Por vezes é preferível fazer extração dentária em cães com doença periodontal moderada a grave, ao invés de submeter o animal a tratamentos dentários repetidos (Hoskins, 2004).

### 2.8.1. Tratamento conservativo – profilaxia

O objetivo principal da terapêutica para a doença periodontal é controlar a placa e prevenir perda de ligação óssea. Um cão cooperante e um dono que possa providenciar tratamento em casa são considerações importantes a ter em conta quando se traça um plano terapêutico. O dono deve estar disposto a escovar os dentes do animal diariamente ou, no mínimo, de dois em dois dias, com escovas que não sejam demasiado abrasivas, como escovas de dentes para crianças ou de veterinária ou com compressas de gaze (Hoskins, 2004). Existem também produtos de higiene oral que ajudam à remoção da placa, como pastas de dentes, líquidos, gel e *sprays* (Hoskins, 2004; Holmstrom et al., 2013).

A dieta é outro dos pontos fulcrais no que toca à profilaxia, sendo que devem ser preferidos os alimentos secos e duros, estando já disponíveis dietas veterinárias indicadas para o controlo da placa e dos cálculos em cães (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012).

### 2.8.2. Tratamento cirúrgico

A destartarização é a forma mais eficaz de remover a placa e os cálculos, devendo incluir o polimento dos dentes e a limpeza do sulco gengival (Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Lobprise, 2012). Pode ser feita com instrumentos mecânicos e manuais. Os primeiros são usados inicialmente na coroa, para remover a maior parte da placa e depósitos de cálculos, existindo já aparelhos de destartarização com fornecimento de água que ajudam a remover de forma mais cuidadosa as bactérias presentes, aumentando a eficácia do tratamento da doença periodontal. Apesar disso, é sempre necessário usar instrumentos manuais para remover a placa e cálculos depositados na coroa e por baixo da gengiva, que não se conseguem remover apenas com os instrumentos mecânicos (Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Holmstrom et al., 2013). Depois da destartarização é essencial proceder ao polimento dos dentes, de forma a minimizar a subsequente acumulação de placa nas superfícies irregulares dos mesmos. Por fim os dentes são tratados com fluor (Hoskins, 2004; Holmstrom et al., 2013).

Segundo Hoskins (2004), é preferível proceder à remoção dos dentes afetados quando há presença de bolsas com mais de 9 mm de profundidade, associadas a perda óssea superior a 70%. Em cães geriátricos é também recomendada a extração dentária no caso de doença periodontal moderada ou grave (Hoskins, 2004). Holmstrom (2013) refere que quando há mais de 50% de recessão gengival é aconselhado proceder à extração dos dentes afetados (Holmstrom et al., 2013).

Como em qualquer procedimento cirúrgico, são necessários alguns cuidados, nomeadamente a realização de uma avaliação pré-cirúrgica, procedendo a um exame físico detalhado, revisão da história clínica do cão e realizando testes laboratoriais de acordo com a idade do animal. Há ainda que ter especial cuidado em fazer sempre sucção e tapar a zona caudal da cavidade oral com gaze, de forma a prevenir aspiração. No final da cirurgia é importante observar esta zona para ver se não fica nenhum corpo estranho instalado. A recuperação pós-operatória



deve incluir, além do tratamento antimicrobiano, o controle da dor e da inflamação (Holmstrom et al., 2013).

### 2.8.3. Tratamento farmacológico

Antes de um procedimento cirúrgico oral é aconselhada a administração de antimicrobianos, em qualquer fase da doença periodontal (Hoskins, 2004; Peddle et al., 2009; Holmstrom et al., 2013), uma vez que está bem documentada no Homem a bacteriemia transitória resultante destes procedimentos, que pode levar a infeções em vários órgãos, como o coração, rins e fígado (Peddle et al., 2009). Apesar disso, ainda se questiona o efeito da administração deste tipo de compostos de forma profilática em pacientes com doença periodontal, não estando provado que ajude a prevenir a incidência de doenças sistêmicas. Além disso, estudos recentes, realizados em pessoas, concluem que a cirurgia dentária não se apresenta como um fator de risco para ocorrência de infeções nos órgãos mencionados, sendo que a maioria dessas infeções não são causadas pelo tratamento cirúrgico da doença periodontal (Peddle et al., 2009). Em cães foram feitos estudos que demonstram que os procedimentos orais podem estar na origem de bacteriemia, mas não existem até agora evidências que ela seja a causa de endocardites bacterianas. Ainda assim, o uso de antimicrobianos antes da cirurgia oral é recomendado, já que os estudos realizados não são totalmente conclusivos (Peddle et al., 2009).

O tratamento farmacológico deve ser adaptado à gravidade da doença periodontal e à sua evolução ao longo do tempo. A associação de amoxicilina com ácido clavulânico e a clindamicina são efetivas contra as bactérias associadas à doença periodontal (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012). Dependendo da gravidade da doença periodontal, a administração de antimicrobianos deve ser prolongada durante 7 dias após o procedimento cirúrgico. Uma associação de amoxicilina com metronidazol é uma alternativa para cães com doença periodontal grave (Hoskins, 2004). Em cães com doença periodontal crónica recorrente podem beneficiar de um tratamento a longo prazo com tetraciclina (Hoskins, 2004; Lobprise, 2012).

A concentração sanguínea adequada de antimicrobiano pode ser alcançada através da administração subcutânea ou intramuscular no momento da administração da pré-medicação cirúrgica, ou mesmo pela administração do antimicrobiano *per os* 24 horas antes do procedimento dentário (Hoskins, 2004).

## 2.9. Complicações da doença periodontal

### 2.9.1. Alterações locais

Além de causar grande dor e desconforto, a doença periodontal pode levar a perda de dentes ou mesmo de tecido ósseo da mandíbula. É comum que ocorram fístulas oronasais nos locais

de perda de tecido ósseo, especialmente em cães pequenos de idade avançada e condrodistróficos (Holmstrom, Frost & Eisner, 2004). As fístulas oronasais formam-se como consequência da progressão da doença periodontal para a superfície palatina dos caninos maxilares, resultando numa comunicação entre as cavidades oral e nasal, e podendo originar infeção. Nestes casos é necessário extrair o dente afetado, fechando a fístula com um *flap* mucogengival (Harvey & Emily, 1993; Niemiec, 2008).

Outra consequência grave é a formação de abscessos em dentes com mais que uma raiz, ocorrendo quando a perda periodontal progride apicalmente, tendo acesso ao sistema endodôntico e causando assim doença endodôntica por contaminação bacteriana. Essa infeção espalha-se pela raiz através da polpa, causando ramificações periapicais nas outras raízes. Estes abscessos formam-se mais comumente no primeiro molar mandibular e ocorre mais frequentemente em cães de raças miniatura geriátricos (Wiggs & Lobprise, 1997; Niemiec, 2008; Hargreaves & Cohen, 2011).

A fratura dentária é também uma consequência da doença periodontal, ocorrendo especialmente na mandíbula, nomeadamente nos caninos e primeiros molares. Isto ocorre devido à perda periodontal crónica que enfraquece o osso das áreas afetadas. O tratamento destas fraturas é essencial, uma vez que causam dor e desconforto. Porém, é difícil recorrer a um tratamento que não envolva a extração do dente afetado, uma vez que a regeneração do dente é difícil por falta de tecido ósseo (Gioso, Shofer, Barros, & Harvey, 2001; Niemiec, 2008).

A proximidade dos ápices dentários dos molares e dos quartos pré-molares maxilares dos tecidos ósseos pode originar inflamações junto da órbita que podem conduzir à cegueira (Smith, Smith, La Croix, & Mould, 2003; Niemiec, 2008). Pode também ocorrer osteomielite crónica, que corresponde a áreas de osso morto e infetado que não responde a tratamento antimicrobiano, sendo normalmente necessário recorrer a cirurgia para tratar estas infeções (Wiggs & Lobprise, 1997; Niemiec, 2008).

### 2.9.2. Alterações sistémicas

Uma vez que esta é uma entidade patológica recorrente ou persistente, que se prolonga por toda a vida do animal, acredita-se que a disseminação sistémica por longos períodos pode levar a doença cardíaca, hepática e/ou renal (Niemiec, 2008; Pavlica et al., 2008). Algumas das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, PGE2 e TNF) libertadas pelas células no local de lesão periodontal são absorvidas para a corrente sanguínea, onde são capazes de induzir e aumentar muitas das complicações vasculares e de coagulação associadas à aterosclerose e doença cardíaca coronária, por processos que são ainda pouco claros, mas que se sabe que passam pela formação de imunocomplexos. Estes produzem mediadores inflamatórios como citocinas, eicosanoides, fatores de crescimento e monóxido de azoto. Os leucotrienos libertados atraem os neutrófilos e promovem a adesão dos leucócitos, exacerbando a

inflamação. Além disso também estimulam a proliferação de células mesangiais e a produção de microfilamento intracelular actina Alpha Smooth Muscle Actin (alfa-SMA) e proteínas da matriz extracelular (Pavlica et al., 2008). Também entram em circulação bactérias como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e bactérias de Gram negativo anaeróbias patogénicas periodontais, incluindo *Porphyromonas gingivalis* e as suas toxinas. Acredita-se que episódios frequentes de bacteriemia possam ocorrer nestes animais como resultado de pequenos traumas nos locais de inflamação periodontal, que podem causar infeção ou estimular inflamação e doença em órgãos distantes (Pavlica et al., 2008).

Lofthus et al. (1991), Lucas & Roberts (2000) e Hartzell, Torres, Kim, & Wortmann (2005) demonstraram que existe uma bacteriemia transitória após mastigação, escovagem dos dentes e intervenções cirúrgicas dentais e orais em pacientes humanos com gengivite ou periodontite (Lofthus et al., 1991; Lucas & Roberts, 2000; Hartzell et al., 2005). Também em pessoas diversos agentes patogénicos periodontais foram isolados ou identificados por PCR em órgãos distantes, nomeadamente nas lesões de ateroma e endocardite (Herzber & Meyer, 1996; Deshpande, Khan, & Genco, 1998; Dorn, Dunn, & Progulske-Fox, 1999; Pavlica et al., 2008). Crossley (2005) afirma que tanto os cães como as pessoas com doença periodontal se expõem a si mesmos a bacteriemia durante cerca de 3 horas diárias, apenas devido a movimentos normais da boca como mastigação, deglutição, lambedura no caso dos cães e vocalização (Crossley, 2005).

O papel da doença periodontal no aparecimento de doenças sistémicas está ainda pouco esclarecido, sendo que se encontra descrito o isolamento de bactérias características da cavidade oral a partir de válvulas cardíacas de cães com doença periodontal (Calvert, Greene, & Hardie, 1985; Hamlin, 1990; Takahasi, Fujisawa, Yamamoto, Kijima, & Takahashi, 2000; Niemiec, 2008). Para além disso foram encontradas lesões histológicas numa grande variedade de órgãos de cães com doença periodontal, nomeadamente alterações nas válvulas átrio-ventriculares (espessamento mixomatoso ligeiro a grave, proliferação endotelial, inflamação e calcificação) (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008). Sabe-se que infeções extra-hepáticas como a periodontite, que está associada a endotoxemia ligeira, podem causar colestase intra-hepática em cães (Taboada & Meyer, 1989; Brandborg & Goldman, 1990; Center, 1990; Pavlica et al., 2008). Nestes animais, tanto a inflamação do parênquima hepático como a fibrose portal foram associadas a doença periodontal (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008). Também pode ocorrer indução de deposição de imunocomplexos que se formam por reação com bactérias, LPS e outros antigénios nos rins dos cães, provocando glomerulonefrites por intermédio da bacteriemia crónica resultante da doença periodontal (Hoffman & Gaengler, 1996; Pavlica et al., 2008). Pode ainda ocorrer pielonefrite e nefrite intersticial como consequência da bacteriemia ou sepsis que ocorre devido a infeções orais, com consequente insuficiência renal crónica (DeBowes et al., 1996; Fournier et al., 2001; Pavlica et al., 2008). Num estudo realizado por Pavlica et al. (2008), os

autores identificaram por necrópsia diversos tipos de doença cardiovascular em cães, principalmente naqueles com mais de 10 anos. A patologia cardiovascular mais frequente foi a degeneração crónica das válvulas cardíacas, tendo também sido encontrados cães com insuficiência cardíaca com evidência de derrame pleural mas sem alterações cardíacas visíveis externamente. Não foi porém observado doença tromboembólica nas coronárias ou outros vasos examinados. Este estudo revelou uma associação significativa entre o grau de doença periodontal e o de doença valvular atrioventricular esquerda (Pavlica et al., 2008). Considera-se que muitas doenças não orais em pacientes humanos e cães podem ser causadas ou exacerbadas pelos mediadores da inflamação em circulação, toxemia crónica e/ou episódios recorrentes de bacteriemia com origem nas lesões periodontais, acreditando-se que existe uma relação entre a extensão das lesões de doença periodontal e o grau de patologia em diversos órgãos (Pavlica et al., 2008).

#### 2.10. Prevenção e profilaxia

O cuidado dentário veterinário é um componente essencial para um plano de saúde preventivo, sendo necessário para uma saúde completa e aumento da qualidade de vida. Se não forem tomados estes cuidados, surgem doenças da cavidade oral que podem ser extremamente dolorosas, além de contribuírem para o aparecimento de doenças sistémicas (Holmstrom et al., 2013).

Por outro lado, a educação dos donos é essencial, sendo necessário um compromisso por parte dos mesmos para que se possa prevenir a doença periodontal. O médico veterinário deverá explicar aos proprietários dos cães que a escovagem diária dos dentes é o *gold standard* da limpeza oral, podendo para isso serem usadas escovas de dentes macias e pastas, géis ou *sprays* apropriados para os animais domésticos (Crossley, 2005; Lobprise, 2012; Marretta, Burgess-Cassler, McClure, Buelow, & Finn, 2012; Holmstrom et al., 2013). Como alternativa podem também usar-se barras de limpeza dentária ou alimentação apropriada para o cuidado dos dentes, que deve providenciar a limpeza mecânica dos dentes, retardando assim a acumulação de placa e cálculos. O médico veterinário deve exemplificar como se limpam os dentes dos cães, para que os donos os façam de forma correta, sem magoar o animal (Crossley, 2005; Lobprise, 2012; Holmstrom et al., 2013). O controlo anual do estado da boca é também aconselhado, não só através do exame físico, mas também através de radiografia, após consentimento dos donos (Marretta et al., 2012; Holmstrom et al., 2013).

#### 2.11. Seguimento

Os donos de cães tratados para a doença periodontal devem ser informados de que o seguimento destes animais deve ser regular, tornando-se importante marcar consultas ou

apenas contactar os donos para saber como está o animal, devendo estes momentos ser aproveitados para relembrar os cuidados que é necessário ter em casa.

O grau de doença periodontal vai definir a frequência de consultas de *check-up* necessárias (Lobprise, 2012; Marretta et al., 2012). Extrapolando da literatura de medicina humana e baseada em *guidelines* acerca do envelhecimento dos cães e gatos, Marretta (2012) formulou recomendações de seguimento que aconselham reavaliações a cada 12 meses, e que devem fazer parte do programa normal de saúde do cão. Em cães com gengivite a avaliação deve ser feita de 6 em 6 meses, sendo que o tempo reduz para 3 a 6 meses quando o animal já tem doença periodontal ligeira a moderada. Em casos de doença periodontal grave a avaliação deve ser feita mensalmente (Marretta et al., 2012).

### 3. Endocardite bacteriana

A endocardite bacteriana é um processo inflamatório do endocárdio, causado geralmente por bactérias que aderem às válvulas e à parede do miocárdio (Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011; Velkers et al., 2011). As válvulas mais comumente afetadas são a mitral e aórtica (Spagnol et al., 2006; Sykes, Kittleson, Chomel, MacDonald, & Pesavento, 2006; Peddle et al., 2009; Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011). A endocardite bacteriana tem baixa prevalência na espécie canina (Cavaguchi et al., 2010), sendo rara em felinos (Sykes et al., 2006; Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011). Ocorre em cães de qualquer idade, com mais frequência nos de porte médio a grande com mais de 4 ou 5 anos e as raças mais predispostas são o Boxer, o Rotweiler, o Dogue Alemão, o Retriever do Labrador e o Pastor Alemão (Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011). Segundo Spagnol et al. (2006), num estudo realizado em 54 cães com endocardite bacteriana os machos foram mais afetados que as fêmeas (Spagnol, Loretto, Oliveira, Oliveira, & Driemeier, 2006). Contudo, Cavaguchi et al. (2010) obtiveram resultados diferentes num estudo realizado no período de janeiro de 2003 a maio de 2008, que incluiu 28 cães que apresentavam a doença, sendo 50% machos e 50% fêmeas (Cavaguchi et al., 2010).

Na maioria das vezes a endocardite bacteriana manifesta-se como uma alteração multissistémica, que resulta em lesões em diversos órgãos, estando associada a alta morbilidade e mortalidade (Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011). Pode ser associada a doenças concomitantes que podem promover a lesão de válvulas ou ainda induzir a síndrome da resposta inflamatória sistémica, como é o caso da sepsis, resultando de uma falha hemodinâmica (Nelson & Couto, 2009; Pacheco, 2011).

O diagnóstico desta doença não é simples, sendo necessário efetuar exames imagiológicos e hemocultura para determinar qual o agente responsável e a sua suscetibilidade a antimicrobianos. O tratamento deve ser realizado por um período longo, acompanhando a evolução da doença (Pacheco, 2011).

### 3.1. Fisiopatogenia

Os processos infecciosos localizados, nomeadamente cutâneos, orais, urinários, prostáticos, ou em outros órgãos, podem resultar em bacteriemia persistente ou transitória podendo conduzir a uma infecção secundária do endocárdio. Os procedimentos cirúrgicos em que facilmente ocorrem contaminações, como os procedimentos odontológicos, endoscopia, cateterização vesical e cirurgia anal, podem também causar bacteriemia transitória e consequente endocardite (Spagnol et al., 2006; Cavaguchi et al., 2010). A colonização microbiana leva a adesão de bactérias às válvulas cardíacas com consequente ulceração do endotélio valvular e exposição do colagénio subendotelial com formação de fibrina, o que vai estimular a agregação plaquetária e a ativação da cascata de coagulação. A superfície endotelial do coração e as válvulas são naturalmente resistentes à invasão microbiana, mas tornam-se suscetíveis quando a superfície é lesada. Como consequência ocorre a formação de nódulos que causam deformações valvulares, incluindo perfurações ou rutura das mesmas, resultando em insuficiência cardíaca (Spagnol et al., 2006; Nelson & Couto, 2009; Cavaguchi et al., 2010; MacDonald, 2010; Pacheco, 2011). Além disso, a deposição de fibrina fornece um ambiente ideal para a colonização por microrganismos, protegendo-os dos mecanismos de defesa imunitária do hospedeiro, dificultando a ação dos antimicrobianos (MacDonald, 2010; Pacheco, 2011). A deformação das válvulas resulta geralmente em insuficiência valvular e em nódulos exuberantes ou cicatrização fibrótica que podem levar a estenose valvular (Nelson & Couto, 2009; Pacheco, 2011).

Macroscopicamente, as válvulas afetadas apresentam massas aderentes, friáveis de coloração amarelada ou amarelo acinzentada, com presença de fibrina e aspeto rugoso. Microscopicamente pode observar-se um processo inflamatório exuberante, com presença de restos celulares e bactérias. Na endocardite parietal ou mural podem observar-se macroscopicamente ulcerações, erosões e/ou mineralização sendo que a coloração varia conforme a alteração, podendo ir de cinza a vermelho. Microscopicamente pode-se notar uma destruição do revestimento endotelial, presença de células inflamatórias e até mesmo mineralização (Pacheco, 2011).

### 3.2. Etiologia

De entre os microrganismos potencialmente envolvidos na endocardite bacteriana em cães, destacam-se *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* e *Proteus* spp. (Gould, Ramirez-Ronda, Holmes, & Sanford, 1975; Peddle et al., 2009; Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011; Velkers et al., 2011).

As consequências e a gravidade da endocardite dependem de diversos fatores, nomeadamente da virulência do agente infeccioso, da duração da infecção, do grau de

destruição valvular, da influência dos nódulos na estrutura e função valvular e da formação de imunocomplexos (Cavaguchi et al., 2010).

Pensa-se que a maior incidência da endocardite bacteriana na válvula mitral possa estar relacionada com o fato de as válvulas do lado esquerdo do coração serem submetidas a maior pressão biomecânica, causando uma maior predisposição a microtraumatismos, favorecendo assim a colonização da superfície endocárdica por bactérias (Cavaguchi et al., 2010).

### 3.3. Sinais clínicos

As manifestações clínicas são variadas e inespecíficas, o que compromete o estabelecimento de um diagnóstico definitivo, que muitas vezes é estabelecido apenas no exame *post mortem*. Porém, os sinais clínicos frequentemente relatados são anorexia, sopro cardíaco, arritmias, letargia, perda de peso, inapetência, distúrbios gastrointestinais, claudicação, taquipneia, pulso femoral hipercinético, dispneia, entre outros.

Em alguns casos os sinais clínicos estão relacionados com a insuficiência ou estenose valvular, bacteriemia crônica, êmbolos sépticos, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo ou infecções em vários órgãos podendo surgir sinais como linfadenite periférica, pneumonia embólica, nefrite, artrite, tenossinovite, miocardite, sinais de vasculite com hemorragias (pele, olhos, mucosas) ou *deficits* neurológicos multifocais decorrentes de meningites ou encefalites (Nelson & Couto, 2009; Pacheco, 2011). Dependendo dos órgãos atingidos pelos imunocomplexos, ou por êmbolos sépticos, podem ainda surgir sinais como extremidades frias, cianose, necrose da pele e distúrbios neurológicos (Spagnol et al., 2006; Nelson & Couto, 2009; Cavaguchi et al., 2010; MacDonald, 2010; Pacheco, 2011). O embolismo, propiciado pelas formações nodulares nas artérias coronárias, resulta em vasculite imunomediada e hipoxia (MacDonald, 2009; Cavaguchi et al., 2010).

As arritmias desenvolvem-se em consequência da invasão bacteriana do miocárdio, afetando 40 a 70% dos animais. Podem ser observadas arritmias graves tais como taquicardia ventricular, fibrilação atrial e completo bloqueio cardíaco (MacDonald, 2009; Cavaguchi et al., 2010).

### 3.4. Diagnóstico

A realização de exames complementares de diagnóstico é necessária, tendo em conta a inespecificidade dos sinais clínicos, como febre e letargia. Com base nos dados clínicos e laboratoriais, hemoculturas, eletrocardiograma e ecocardiografia, poderá ser estabelecido um diagnóstico provável (Spagnol et al., 2006; Cavaguchi et al., 2010). O diagnóstico por imagem pode permitir a observação de alterações valvulares, mas a hemocultura é o teste mais específico para determinar o agente e caracterizar o seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (Pacheco, 2011), apresentando a hemocultura uma sensibilidade de aproximadamente 80% (Cavaguchi et al., 2010).

#### 3.4.1. Exames laboratoriais

Os resultados laboratoriais mais usuais são relativos a processos inflamatórios, observando-se no hemograma neutrofilia com desvio à esquerda em casos agudos e neutrofilia com monocitose em doenças crônicas. Em 2006, Sykes et al. realizaram um estudo com 71 cães com endocardite, dos quais 61 foram submetidos a avaliação laboratorial que incluiu hemograma, análises bioquímicas séricas e urianálise. As alterações mais frequentes foram leucocitose (89%), trombocitopenia (50%), anemia não regenerativa (41%), hipoalbuminemia (95%), aumento da concentração de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina sérica (FAS) ou gama glutamil transferase (GGT) sérica (70%), azotemia (42%), aumento da concentração de creatinina sérica (28%), proteinúria (62%), hematúria (62%) e piúria (60%) (Sykes et al., 2006).

#### 3.4.2. Hemocultura

Como já mencionado, a hemocultura é essencial para chegar a um diagnóstico definitivo de endocardite bacteriana. Para poder utilizar este método diagnóstico é necessário recolher amostras de locais diferentes e quando existem pelo menos duas amostras positivas, existe forte probabilidade de se estar perante um caso de endocardite bacteriana.

A técnica consiste em recolher três amostras de locais diferentes em intervalos de uma a duas horas, num período de vinte e quatro horas. Posteriormente as amostras são submetidas a cultura bacteriana em condições de aerobiose e anaerobiose (Nelson & Couto, 2009; Pacheco, 2011).

No entanto os resultados negativos na hemocultura não descartam a possibilidade de endocardite bacteriana, podendo ocorrer em casos de prévia antibioterapia, endocardite crónica, uremia, endocardite bacteriana direita, culturas negativas para bactérias anaeróbias e endocardite não bacteriana ou não infecciosa (Pacheco, 2011).

#### 3.4.3. Diagnóstico por imagem

A ecocardiografia pode facilitar o diagnóstico e a monitoração dos doentes, sendo imprescindível para a visualização de alterações na silhueta cardíaca e vibração ocasionada pela regurgitação aórtica e para a avaliação funcional e estrutural das válvulas. Algumas consequências dos nódulos valvulares podem ser observadas, como avulsão da válvula mitral, dilatação de câmaras cardíacas, insuficiência do miocárdio e formação de abscessos. Os nódulos pequenos podem ser difíceis de visualizar, principalmente em animais pequenos, obesos ou com dispneia. No início da doença, as lesões caracterizam-se por um discreto espessamento valvular e/ou aumento da ecogenicidade (Cavaguchi et al., 2010).

No exame radiográfico pode observar-se aumento da silhueta cardíaca e edema pulmonar em casos mais avançados (Cavaguchi et al., 2010). Num estudo realizado por Sykes et al. (2006), os autores observaram alterações cardiopulmonares ao exame radiográfico em 67,8% dos



cães com endocardite bacteriana. As alterações radiográficas mais frequentemente observadas são cardiomegalia generalizada, infiltrado pulmonar intersticial focal ou difuso, infiltrado broncointersticial, aumento do átrio esquerdo e infiltrado alveolar (Sykes et al., 2006; Pacheco, 2011).

#### 3.4.4. Eletrocardiograma

O eletrocardiograma pode apresentar-se normal ou com alterações, tais como batimentos prematuros, taquicardias, distúrbios de condução, evidência de isquemia do miocárdio e bloqueio átrio-ventricular de primeiro, segundo ou terceiro grau (Nelson & Couto, 2009; Cavaguchi et al., 2010; Pacheco, 2011).

#### 3.5. Tratamento

O objetivo da terapêutica é eliminar os focos de infecção e proceder ao tratamento de todas as complicações secundárias (Cavaguchi et al., 2010). O tratamento deve ser realizado por um período longo (um a três meses), acompanhando-se a involução dos nódulos valvulares através de ecocardiografia. Deve ter-se presente que é necessário fazer uma terapêutica antimicrobiana agressiva, de acordo com os resultados da cultura bacteriana e do antibiograma (Rush & Bonagura, 2008; Cavaguchi et al., 2010). Enquanto se espera os resultados destes exames, recomenda-se o estabelecimento de terapêutica empírica com antimicrobianos como cefalosporinas, penicilinas, aminoglicosídeos ou fluoroquinolonas, administrados por via endovenosa ou intramuscular na primeira semana e posteriormente por via oral durante pelo menos quatro a seis semanas. A função renal deve ser monitorizada quando a antibioterapia é feita com aminoglicosídeos, dada a sua nefrotoxicidade intrínseca. O tratamento de suporte deve ser iniciado quando estiverem presentes arritmias e insuficiência cardíaca congestiva, distúrbios eletrolíticos e problemas nutricionais (Cavaguchi et al., 2010).

#### 3.6. Prognóstico

O prognóstico da endocardite bacteriana varia de reservado a mau, sendo que a longo prazo muitos cães acabam por morrer. Ele é reservado em casos de envolvimento exclusivo da válvula mitral, nas infeções por bactérias de Gram positivo e nos casos em que a infeção tem origem na pele. O prognóstico é mau nas situações em que tanto o diagnóstico clínico definitivo como o início da terapêutica são realizados tardiamente, bem como nos casos em que há presença de lesões de endocardite em diversas válvulas, arritmias graves e insuficiência cardíaca refratária, além de lesões em outros sistemas (Cavaguchi et al., 2010). A profilaxia de possíveis causas de endocardite bacteriana devem ser enfatizadas ao proprietário, focando as consequências a nível orgânico decorrentes da disseminação bacteriana pelo organismo (Nelson & Couto, 2009).

#### 4. A infecção a *Enterococcus*

As doenças infecciosas continuam a ser uma das principais causas de mortalidade nos países em vias de desenvolvimento. Já as bactérias do género *Enterococcus* são causas cada vez mais frequentes de IACS em pacientes humanos, provocando doenças transmitidas por via hematogénea e infeções do trato urinário (Semedo-Lemsaddek et al., 2012; Nielsen et al., 2013). O aumento da resistência a antimicrobianos e de intervenções médicas invasivas têm contribuído significativamente para este aumento (Nielsen et al., 2013).

O género *Enterococcus*, agrupa bactérias muito diversas, podendo ser consideradas comensais ou patogénicas. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são consideradas as mais importantes deste género, por serem as mais frequentes e também as mais virulentas (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Devido à sua capacidade de sobreviverem e de se multiplicarem em condições hostis os enterococos disseminam-se numa grande variedade de ambientes, incluindo o trato gastrointestinal de pessoas e animais, alimentos e água, havendo estudos que apontam para a disseminação destes microrganismos através da cadeia alimentar ou por contacto direto entre pessoas, animais e o ambiente. Ainda pouco se sabe sobre os fatores que contribuem para as infeções causadas por bactérias do género *Enterococcus*, mas têm sido descritos diversos fatores de virulência e resistências a inúmeros antimicrobianos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Em relação ao papel dos fatores de virulência dos enterococos na clínica de animais de companhia existe pouca informação, sendo necessários mais estudos que o esclareçam. Porém, talvez grande parte do potencial de patogenicidade possa ser extrapolado para os esses animais a partir do que se sabe acerca das infeções no Homem.

##### 4.1. Características gerais do género *Enterococcus*

O género *Enterococcus* pertence ao domínio *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e à família *Enterococcaceae* (Garrity, 2007).

As bactérias deste género possuem uma forma ovoide, podendo surgir de forma individualizada ou organizada em pares ou cadeias curtas. São bactérias de Gram positivo, oxidase e catalase negativas, embora algumas estirpes revelem atividade de pseudocatalase em meio suplementado com sangue, como é o exemplo de *E. faecalis*. São também anaeróbias facultativas não esporuladas e algumas estirpes podem apresentar mobilidade, possuindo um flagelo de tamanho reduzido. Há ainda algumas espécies que possuem pigmentação carotenoide (Facklam, Carvalho, & Teixeira, 2002; Tanasupawat, Sukontasing, & Lee, 2008; Svec & Devriese, 2009; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

A maioria dos enterococos cresce a temperaturas entre os 10 e os 45°C, sendo que determinadas espécies podem resistir durante 30 minutos a 60°C. Estas bactérias crescem em presença de NaCl a 6,5% e a valores de pH de 9.6 e hidrolisam a esculina na presença

de 40% de sais biliares. Contudo, deve ser tido em conta o facto de nem todos os enterococos possuírem as características descritas (Facklam et al., 2002; Tanasupawat et al., 2008; Svec & Devriese, 2009; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

O habitat predominante destes microrganismos é o trato gastrointestinal de mamíferos, aves e outros animais, apesar de serem considerados microrganismos ubíquos, podendo ocupar diferentes nichos ecológicos como plantas, vegetais, alimentos crus e fermentados, solos e águas superficiais, entre outros (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

#### 4.2. Identificação de bactérias do género *Enterococcus*

Atualmente é usada uma vasta variedade de métodos fenotípicos e moleculares para a identificação e classificação destes microrganismos. A identificação torna-se essencial para a proteção e segurança alimentar e ambiental, assim como para o diagnóstico e vigilância da saúde pública (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). A identificação ao nível da espécie usada por rotina em diversos laboratórios baseia-se em métodos fenotípicos, apesar de esta abordagem se poder tornar pouco fiável, já que, como acima referido, algumas espécies de *Enterococcus* não apresentam as características típicas deste género (Ke et al., 1999). Assim, a utilização e evolução dos métodos moleculares para a análise microbiana tem vindo a tornar-se mais importante de dia para dia, tendo como objetivo alcançar metodologias fidedignas, rápidas e simples para posterior aplicação rotineira em laboratórios, de maneira a melhorar a segurança e qualidade da análise. No caso dos enterococos já foram desenvolvidos variados métodos moleculares para a sua deteção e identificação ao nível de género ou de espécie, nomeadamente PCR, *real-time* PCR, PCR-*fingerprinting* e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) (Facklam et al., 2002; Semedo-Lemsaddek, Tenreiro, Alves, & Barreto-Crespo, 2010; Semedo-Lemsaddek, Tenreiro, Alves, & Barreto-Crespo, 2011; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

#### 4.3. Potencial de patogenicidade e virulência

As bactérias do género *Enterococcus* constituem um risco potencial para a saúde humana e animal, sendo bactérias patogénicas oportunistas que não provocam doença em indivíduos saudáveis, mas são responsáveis por infeções graves em indivíduos imunocomprometidos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Apesar de durante muitos anos estas bactérias terem sido consideradas inofensivas para o Homem, hoje em dia estão relacionados com inúmeras IACS. Porém, ainda está por se perceber como é que estas bactérias fazem a transição entre um papel comensal e um patogénico (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

A patogenia dos processos infecciosos depende dos mecanismos de virulência do organismo invasor bem como dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, algumas características do hospedeiro têm um papel importante na resistência ou suscetibilidade à infeção. Estas

características incluem stresses físicos e emocionais, idade, saúde geral, estado de nutrição e higiene pessoal. (Mims, Nash, & Stephen, 2001; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

A inerente tolerância dos enterococos a condições pouco favoráveis permite-lhes sobreviver por longos períodos em ambiente hospitalar, mesmo que em superfícies abióticas, e os funcionários dos hospitais assim como os instrumentos por eles usados, são geralmente responsáveis pela transmissão de infecções entre os pacientes internados (Klein, 2003; Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Estas características contribuem para um risco crescente de IACS provocadas por enterococos, tornando-se vital ter cuidados acrescidos com a higiene e desinfecção deste tipo de ambientes (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são, nestas situações, predominantes considerando-se que 80 a 90% das infecções humanas são causadas por *E. faecalis* e cerca de 10 a 20% por *E. faecium* (Facklam et al., 2002; Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Porém, na última década foram realizados estudos que registaram rácios semelhantes (1:1 ou 1,5:1) de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de infecções sistémicas (Das & Gray, 1998; Top et al., 2007; Hidron et al., 2008; Semedo-Lemsaddek et al., 2012), apesar de estes valores poderem variar de região para região e conforme a unidade de saúde em estudo (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Os microrganismos destas duas espécies são resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica, incluindo as cefalosporinas e os aminoglicosídeos. A rápida disseminação de enterococos resistentes à vancomicina tem sido também causa de grande preocupação. Esta resistência está associada principalmente à espécie *E. faecium*, sendo a resistência de *E. faecalis* a este fármaco muito menos frequente (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

#### 4.3.1. Resistências a antimicrobianos

Os enterococos são considerados *low-level pathogens*, no entanto a sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e a sua capacidade de aquisição de resistência a outros disponíveis para tratamento clínico, levantam inúmeras preocupações (Giraffa, 2002; Vignaroli, Zandri, Aquilanti, Pasquaroli, & Biavasco, 2011). A resistência intrínseca (natural) é mediada por genes localizados no cromossoma, sendo esta uma característica presente em quase todas as estirpes, e a resistência extrínseca (adquirida) é mediada por genes que residem em plasmídeos ou transposões (Franz, Stiles, Schleifer, & Holzapfel, 2003; Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, & Vuyst, 2006; Barbosa, Ferreira, & Teixeira, 2009).

A ampla utilização de antimicrobianos não só induz a seleção de bactérias patogénicas resistentes, como também exerce pressão seletiva da microbiota comensal (Aminov, Garrigues-Jeanjean, & Mackie, 2001). Assim, o aumento da incidência de enterococos resistentes a antimicrobianos poderá dever-se ao uso excessivo dos últimos (Lopes, et al., 2005) (Vignaroli, et al., 2011). Desta forma, o problema da resistência a antimicrobianos em

enterococos não se restringe a contextos clínicos, abrangendo também outros ambientes como o trato intestinal de pessoas e animais saudáveis (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012). Os enterococos podem atuar como reservatórios de genes que conferem resistência a antimicrobianos (Aminov, et al., 2001; Semedo-Lemsaddek, et al., 2012), explicando a rápida disseminação da resistência entre estas bactérias (Aminov, et al., 2001). A transmissão de genes de resistência a antimicrobianos pode ser realizada horizontalmente por diversos processos, nomeadamente conjugação, transformação ou transdução, através de plasmídeos, transposões ou integrões (Delgado, Fracchetti, Mayo, & Torriani, 2011). Em enterococos, a transferência de genes ocorre essencialmente por conjugação, embora já existam alguns relatos que sugerem que o processo de transdução pode também ser frequente (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.1.1. Resistência intrínseca

Todos os enterococos são intrinsecamente resistentes a penicilinas semissintéticas (por exemplo, oxacilina), a todas as classes de cefalosporinas e a polimixinas. Relativamente aos aminoglicosídeos apresentam resistência a níveis baixos destes agentes, provavelmente devido a uma absorção reduzida. Quanto à clindamicina, os isolados das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são geralmente resistentes (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012). A resistência às fluoroquinolonas, nomeadamente à ciprofloxacina, está provavelmente associada com a expressão de homólogos cromossômicos do gene *qnr* (funcionalmente comprovada apenas para *E. faecalis* (Arsene & Leclercq, 2007). Os isolados de *E. faecalis* são também resistentes a mupirocina, característica essa que pode ser usada para diferenciá-los das outras espécies de enterococos. Apesar de não atingir o nível definido para a resistência, as penicilinas são geralmente menos ativas contra enterococos do que contra estreptococos e, além disso, a espécie *E. faecium* é menos suscetível a este agente do que *E. faecalis* (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.1.2. Resistência extrínseca

Além de possuírem um largo espectro de resistências intrínsecas a antimicrobianos, *E. faecalis* e *E. faecium* têm ainda um elevado potencial para adquirir resistência a grande parte dos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado. Entre eles encontram-se a penicilina, ampicilina, gentamicina, estreptomicina e glicopeptídeos (nomeadamente a vancomicina), que são de grande importância a nível terapêutico, quer no Homem quer nos animais (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.2. Fatores de virulência

A resistência a antimicrobianos em enterococos não é suficiente para explicar a virulência destas bactérias (Franz, et al., 2001; Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, & Vuyst, 2006).

No passado considerava-se que os enterococos possuíam características de virulência subtis, que eram difíceis de identificar. No entanto, foram desenvolvidos progressos na identificação de fatores de virulência de isolados clínicos, sendo que cada um deles pode estar associado a uma ou a mais fases da infecção (Franz, Stiles, Schleifer, & Holzapfel, 2003). Os fatores de virulência em enterococos incluem fatores associados com a colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro, assim como resistência específica e não específica aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, estirpes virulentas podem provocar mudanças patológicas diretamente, por produção de toxinas ou indiretamente, por inflamação (Franz, Huch, Abriouel, Holzapfel, & Gálvez, 2011). Certas características do hospedeiro humano possuem um importante papel no que diz respeito à sua suscetibilidade ou resistência à infecção, incluindo *stress* físico e emocional, idade, higiene pessoal e estado geral de saúde e nutricional (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Apesar da descrição de vários fatores de virulência no gênero *Enterococcus*, principalmente na espécie *E. faecalis*, e apesar de ser considerado que quanto maior for o número de fatores de virulência presentes, mais grave será a doença causada, nenhum fator é considerado essencial ou suficiente para causar doença e nenhum foi considerado como sendo ubíquo em isolados clínicos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Da mesma forma que estes microrganismos têm capacidade em adquirir resistência a antimicrobianos por transferência de elementos genéticos móveis, fatores de virulência como a produção de citolisina e a capacidade de adesão também são conhecidos por serem transmitidos por mecanismos de transferência gênica (Eaton & Gasson, 2001).

#### 4.3.2.1. Adesinas

A aderência aos tecidos do hospedeiro é um passo crucial no processo de infecção. Visto que as adesinas promovem a ligação aos receptores das células hospedeiras, é espectável que estas possuam um importante papel no estabelecimento e manutenção da colonização (Semedo, et al., 2003a). Sabe-se também que além de promoverem a ligação a componentes da matriz extracelular, a células eucarióticas e a linhas celulares humanas, as adesinas também promovem a ligação a componentes abióticos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

A substância de agregação (SA) é a adesina mais bem estudada em enterococos. A expressão desta proteína de superfície é induzida por feromonas (Semedo, et al., 2003a), estando envolvida na formação de agregados entre células dadoras de plasmídeos e células recetoras, facilitando a transferência de plasmídeos conjugativos. Adicionalmente, medeia a aderência a diferentes células do hospedeiro (Semedo-Lemsaddek et al., 2012), atuando como fator de virulência durante o processo de infecção (Semedo, et al., 2003a). Desta forma, a SA contribui tanto para a disseminação de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos codificados por plasmídeos, como para a colonização de células eucarióticas e respetiva internalização, resultando na invasão dos tecidos. Esta adesina é codificada pelo

gene *agg*, que se localiza ou em plasmídeos que respondem a feromonas sexuais de enterococos, tais como pAD1, pPD1 e pCF10 ou em ilhas de patogenidade cromossômicas (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Outro exemplo de adesina é a proteína de superfície Esp (*enterococcal surface protein*), que foi inicialmente identificada e caracterizada por Shankar et al. (1999), em isolados clínicos de *E. faecalis*. É uma proteína extracelular de elevada massa molecular, codificada cromossomicamente pelo gene *esp* (Shankar, Baghdayan, Huycke, Lindahl, & Gilmore, 1999). O seu verdadeiro papel na virulência em enterococos ainda está sob análise. No entanto, a elevada prevalência do gene *esp* em isolados clínicos, evidencia indiretamente que este contribui para a patogenidade destes microrganismos e para a sua transmissão nosocomial. Além disso, vários estudos sugerem que *esp* contribui para a colonização e persistência de enterococos nas células epiteliais do trato urinário, na matriz extracelular do hospedeiro humano e na formação de biofilmes em superfícies abióticas (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Os genes *ebp* estão também envolvidos na formação de biofilmes. Nallapareddy et al. (2006) reportaram que as três proteínas Ebp (A, B e C) são componentes das fímbrias de superfície presentes na espécie *E. faecalis* e que mutações nesses genes reduzem de forma abrupta a formação de biofilme. Mutações nos genes *ebpABC* levam a alterações nos passos iniciais da formação de biofilme, indicando que esses genes estão envolvidos na ligação inicial a superfícies celulares e/ou abióticas. Estes fatores de virulência fazem parte da família MSCRAMM (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) e estão envolvidos nos passos iniciais do processo de infecção, nomeadamente das endocardites. O pilus de *E. faecalis* aparenta ser formado pelo cruzamento das três proteínas Ebp, mas o mecanismo exato de ação nas endocardites e na formação de biofilmes não está ainda completamente entendido (Nallapareddy, Wenxiang, Weinstock, & Murray, 2005).

A proteína Ace (adesina de ligação ao colagénio da espécie *E. faecalis*) é um componente específico da superfície microbiana de *E. faecalis* que reconhece as moléculas da matriz extracelular do tecido conjuntivo do hospedeiro, mediando a ligação ao colagénio tipo I e IV e à laminina (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Lebreton et al. foram os primeiros a demonstrar que esta proteína é um fator de virulência dos enterococos, uma vez que em modelos experimentais de murinos promoveu a fixação e colonização desses microrganismos no tecido renal (Lebreton, et al., 2009). Também em modelos experimentais de endocardite foi observada a formação de nódulos nas válvulas de corações de ratos por enterococos produtores da proteína Ace. No entanto, as contribuições de Ace ou de anticorpos específicos para esta proteína na patogénese da infecção por enterococos e as condições fisiológicas que regulam a sua expressão são desconhecidas. Sabe-se no entanto que a produção desta adesina é induzida por temperaturas elevadas (46°C), pela presença de sais biliares e *in vivo*

pelo soro, urina e componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo do hospedeiro (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Estudos sobre a capacidade de isolados de *E. faecium* aderirem às proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, a vitronectina e a lactoferrina conduziram à identificação de uma adesina de ligação ao colagénio tipo I na espécie *E. faecium*, denominada Acm (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Esta adesina é de grande importância no processo de infeção, pois o colagénio é a principal proteína estrutural da matriz extracelular e a mais abundante em vertebrados. Uma investigação recente analisou 90 isolados de *E. faecium* tendo-se concluído que o gene *acm* é predominantemente detetado em enterococos de origem clínica. Atualmente considera-se que a proteína Acm contribuiu para a evolução de *E. faecium* de um comensal geralmente avirulento para um agente patogénico associado a IACS de terapêutica complicada, provocadas por bactérias multirresistentes. A contribuição do gene *acm* para o estabelecimento de infeções foi ainda estudada usando modelos de endocardite em rato, tendo sido verificada a sua relação com a gravidade das infeções. Porém, são ainda necessárias investigações adicionais acerca do papel desta proteína (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Da análise do soro de doentes com endocardite provocada por *E. faecalis*, foi identificado um antígeno semelhante a adesinas, designado por EfaA (antígeno A de *E. faecalis*) (Lowe, Lambert, & Smith, 1995). Estudos em modelos animais (ratos) sugerem que EfaA seja um fator de virulência envolvido na infeção de tecidos de hospedeiros humanos. Além disso, presume-se que também estejam envolvidos na adesão a superfícies bióticas e abióticas (Valenzuela, et al., 2008). Genes que codificam adesinas semelhantes a EfaA foram detetados em outras estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo estes *efaA<sub>fs</sub>* e *efaA<sub>fm</sub>* respetivamente (Semedo, et al., 2003a). Eaton e Gasson (2001) referem que, apesar da influência na patogenicidade em modelos animais do gene *efaA<sub>fs</sub>* já ter sido demonstrada, o papel de *efaA<sub>fm</sub>* ainda não é claro.

#### 4.3.2.2. Fatores secretados

Os enterococos disseminam-se no interior do hospedeiro através da produção de exoproteases e hemolisinas, as quais além de causarem danos nos tecidos, podem hidrolisar componentes do sistema imunitário, como proteínas do sistema de complemento e imunoglobulinas, facilitando assim a progressão da infeção (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). O primeiro fator de virulência a ser descrito no género *Enterococcus* foi detetado devido à capacidade hemolítica destas bactérias, sendo que nos dias de hoje essa ação é atribuída à citolisina. Esta hemolisina é comumente denominada citolisina devido à ampla gama de células alvo, que inclui tanto células eucariotas como procariotas (Semedo, et al., 2003b). Este é o fator de virulência melhor caracterizado nestas bactérias, sendo considerado como uma proteína-toxina que causa reações  $\beta$ -hemolíticas em eritrócitos de pessoas, coelhos, bovinos



e cavalos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). A atividade da citolisina está associada ao aumento da virulência de enterococos em modelos de infecção e em estudos epidemiológicos, estando relacionada com a mortalidade dos pacientes. Esta é codificada ou por plasmídeos que respondem a feromonas, como o pAD1, ou por ilhas de patogenicidade cromossômicas (Poeta, Costa, Klibi, Rodrigues, & Torres, 2006). O operão que regula a produção de citolisina é codificado por cinco produtos génicos que segundo Semedo et al. (2003b), são necessários e suficientes para a expressão deste fator de virulência.

O modelo para a expressão e ativação da citolisina inclui duas subunidades estruturais de citolisina, que são codificadas pelos genes *cyLL* e *cyLS*. Estas são modificadas pós-transducionalmente no interior da célula, pelo produto do gene *cyIM*. Posteriormente, são transportadas para o exterior por um transportador ABC, codificado pelo gene *cyIB*. Após externalização, os componentes precursores da citolisina são ativados pelo produto do gene *cyIA* (ativador extracelular) (Semedo, et al., 2003b). Apesar de vários estudos mostrarem claramente que a citolisina apresenta um papel importante na virulência de enterococos, o preciso mecanismo que contribui para a infecção ainda não foi determinado (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Outro dos fatores de virulência mais bem estudado em enterococos é a gelatinase. Esta é caracterizada como sendo uma metaloendopeptidase extracelular capaz de hidrolisar gelatina, colagénio, caseína e outros pequenos péptidos biologicamente ativos, sugerindo a sua participação na iniciação e propagação do processo inflamatório (Semedo, et al., 2003a). O gene *gelE* codifica a gelatinase e está localizado junto ao gene *sprE*, que codifica uma endopeptidase de serina. Ambos os genes se localizam a jusante do locus *fsr*, que é composto pelos genes *fsrA*, *fsrB*, e *fsrC* (Poeta, et al., 2006). Estes regulam positivamente a expressão tanto de *gelE* como de *sprE* e são necessários para a atividade da gelatinase (GelE) e da endopeptidase de serina (SprE) (Franz et al., 2003; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

A contribuição de outros fatores secretados como lipases e desoxirribonuclease (DNase), em infeções causados por enterococos continua a necessitar de ser esclarecida (Semedo, et al., 2003a). No entanto, no que diz respeito à atividade lipolítica, uma variedade de lipases já foi descrita, sendo que o papel mais proeminente das lipases extracelulares passa pela digestão de lípidos celulares do hospedeiro para a obtenção de nutrientes, resultado na adesão e invasão do mesmo (Furumura, Figueiredo, Carbonell, Darini, & Yano, 2006). Quando à DNase, esta permite a degradação de estruturas extracelulares compostas por cromatina, excretadas pelos neutrófilos, facilitando a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.2.3. Feromonas sexuais

Sabe-se que o processo de conjugação é o mais importante mecanismo de transferência horizontal de genes em cocos de Gram positivo, como os enterococos, sendo este facilitado pela produção de feromonas sexuais (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

Vários autores consideram que as feromonas sexuais (pequenos polipéptidos secretados), apesar de favorecerem a disseminação de caracteres de virulência e de resistência a antimicrobianos, não podem ser consideradas por si só como fatores de virulência. Contudo, Eaton e Gasson (2001) têm opinião contrária visto que as feromonas estão envolvidas nas fases iniciais dos processos de conjugação, estando também envolvidas no desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Além disso, são também quimiotáticas *in vitro* para os leucócitos polimorfonucleares de pessoas e ratos.

O sistema das feromonas sexuais foi descoberto pela observação de uma reação de aglutinação em estirpes de *E. faecalis* durante a transferência conjugativa de plasmídeos. Verificou-se que apenas um tipo especial de plasmídeos em *E. faecalis*, denominados plasmídeos que respondem a feromonas, são transferidos por via deste mecanismo. Estirpes recetoras, que podem ser ou não livres de plasmídeos, secretam feromonas sexuais codificadas pelo cromossoma, indicando que estas não possuem os plasmídeos que respondem às respetivas feromonas excretadas. Estirpes dadoras são capazes de detetar a presença de feromonas sexuais e como resposta sintetizam a proteína de agregação. Esta adesina vai permitir o contacto físico entre as estirpes dadoras e recetoras levando à transferência conjugativa do plasmídeo que responde a feromonas. Após a transferência do plasmídeo a síntese da adesina cessa, levando ao desaparecimento dos aglomerados bacterianos. Deve ainda ser enfatizado o facto de que quando um plasmídeo específico é adquirido pela célula recetora, esta deixa de excretar a feromona correspondente, excretando apenas outras feromonas, cujos plasmídeos ainda não tenham sido adquiridos (Wirth, 1994). Os plasmídeos que respondem a feromonas são comumente encontrados na espécie *E. faecalis* e eventualmente na espécie *E. faecium*. Mais de vinte plasmídeos de feromonas foram já identificados, sendo que pAD1, pPD1 e pCF10 são os mais estudados. Estes plasmídeos podem também codificar fatores de virulência como a citolisina e/ou elementos de resistência a antimicrobianos como as tetraciclina, os glicopéptidos e os aminoglicósidos (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.2.4. Fatores de virulência menos bem caracterizados

Existem diversos fatores de virulência que estão ainda por caracterizar, mas que aparentam ter importância na formação do processo inflamatório (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012). Um desses casos é o *Bop* (biofilme em plástico), codificado por um operão tetragénico envolvido no metabolismo da maltose e na formação de biofilmes (Creti, Koch, Fabretti, Baldassarri, & Huebner, 2006). Os enterococos produtores de *Bop* parecem estar associadas à colonização

do intestino, sendo este efeito aumentado pela presença de oligossacáridos nos alimentos (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

Epa (antigénio polissacárido de enterococos) é característico da espécie *E. faecalis* e confere-lhe resistência à fagocitose, dando assim uma proteção extra contra o sistema imunitário do hospedeiro (Teng, Jacques-palaz, Weinstock, Murray, & Haven, 2010).

Gls24 é uma proteína de *stress* geral de enterococos, tendo assim contribuído para o desenvolvimento da infeção. Porém, esta proteína pode ter um papel mais importante na patogenicidade das bactérias do género *Enterococcus* pois foi demonstrado num modelo de peritonite em rato que a presença desta proteína leva a um aumento considerável da mortalidade (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

A proteína ElrA (proteína A rica em leucina de enterococos) pertence à família de proteínas de superfície WxL. ElrA possui um péptido de domínio N-terminal rico em leucina, possivelmente relacionado com a sua interação com as células do hospedeiro e um domínio C-terminal relacionado com a ligação dos peptidoglicanos às células do hospedeiro (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

#### 4.3.3. Síndromes clínicas

Como referido, várias espécies de *Enterococcus* causam infeções adquiridas em ambiente hospitalar ou na comunidade. Entre os pacientes hospitalizados as síndromes clínicas mais frequentes incluem infeções do trato urinário, infeções intra-abdominais e pélvicas, bacteriemia, endocardite, infeções relacionadas com colocação de cateteres, feridas e infeções de tecidos moles. Por vezes podem também causar sepsis neonatal e mais raramente meningite e infeções da cavidade pleural e óssea e tendem a afetar idosos, principalmente do sexo masculino, e recém-nascidos (Butler, 2006; Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

As infeções causadas por enterococos ocorrem principalmente em hospedeiros com o sistema imunitário comprometido, nomeadamente pacientes transplantados, recém-nascidos, pacientes com neoplasias ou que receberam terapêutica antibiótica de largo espectro prolongada (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

#### 4.3.4. Infeção por *Enterococcus* spp.

Seguindo os passos da infeção, que incluem persistência no ambiente, adesão e invasão do organismo, disseminação local/sistémica e evasão às defesas do hospedeiro, é possível fazer uma extrapolação do que ocorre nas infeções causadas por enterococos no Homem para os animais, por forma a entender um pouco do mecanismo que pode estar na origem destas infeções ainda pouco exploradas nos animais de companhia. Inicialmente é necessário ter em conta o que já foi mencionado acerca dos enterococos e à sua capacidade de persistência no ambiente, que os torna aptos a colonizar uma série extremamente variada de nichos

ecológicos. Além disso, sabe-se que os enterococos aderem e invadem o corpo humano através de mecanismos específicos. Apesar de estes microrganismos não serem capazes de penetrar a pele humana, os instrumentos como cateteres e seringas podem atuar como portas de entrada no corpo do hospedeiro. Além disso, muitos enterococos têm a capacidade de aderir e formar biofilmes tanto em superfícies bióticas como abióticas, uma vez que produzem adesinas, fimbriais ou não fimbriais (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). As adesinas promovem a ligação a materiais abióticos, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo e células eucariotas e podem estar implicadas na formação de biofilme. Durante a infecção, os enterococos estão principalmente localizados no meio extracelular, sendo provável que adiram à matriz extracelular do hospedeiro, composta por glicoproteínas e glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina e colagénio, células epiteliais e endoteliais subjacentes e células do tecido conjuntivo circundante (Zareba, Pascu, Hryniewicz, & Wadström, 1997; Semedo-Lemsaddek et al., 2012). A matriz extracelular é exposta quando a integridade do tecido é alterada, ficando a matriz extracelular (tecido conjuntivo) exposta. Os enterococos conseguem assim aderir a componentes dessa matriz, nomeadamente ao colagénio e à fibronectina (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Posteriormente, de modo a sobreviver no interior do hospedeiro, os enterococos devem tolerar a secreção de compostos inibitórios produzidos pelo hospedeiro, nomeadamente bÍlis, valores baixos de pH, elevada osmolaridade, gradientes de oxigénio e fluidos corporais, como o sangue ou a urina. Os enterococos são conhecidos por serem intrinsecamente resistentes a estes e outros tipos de *stress* ambiental (Semedo et al., 2003; Solheim, Aakra, Vebø, Snipen, & Nes, 2007; Carlos, Santos, Semedo-Lemsaddek, Barreto-Crespo, & Tenreiro, 2009; Vebø, Solheim, Snipen, Nes, & Brede, 2010; Semedo-Lemsaddek et al., 2012), produzindo exoproteases e hemolisinas (citolisina, gelatinase, hialuronidase), que além de provocar danos nos tecidos, fornecem nutrientes para a multiplicação bacteriana no local da infeção (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Além de tudo o anteriormente mencionado, os enterococos são capazes de sobreviver no interior de macrófagos, podendo estes servir como veículos que facilitam a translocação das bactérias do intestino para o sistema linfático e circulação sanguínea, contribuindo para a sua propagação no organismo (Wells, Jechorek, & Erlandsen, 1990; Semedo-Lemsaddek et al., 2012). As proteases por eles produzidas podem ainda hidrolisar componentes do sistema imunitário, tais como fatores do complemento e imunoglobulinas, impedindo a resposta imunitária durante a infeção. Os enterococos possuem uma cápsula que protege a superfície bacteriana, prevenindo ou minimizando a ativação do complemento e a fagocitose. Estas capacidades fazem com que o reconhecimento pelos anticorpos seja dificultado, diminuindo assim a resposta do sistema imunitário à infeção (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

### 1. Objetivos do estudo

Na área da medicina veterinária é importante esclarecer dúvidas que persistem, em relação ao potencial risco da doença periodontal para a saúde do animal, incluindo o desenvolvimento de endocardites bacterianas. Considerando a intervenção das bactérias do género *Enterococcus* em ambas as doenças referidas e tendo em conta a cada vez maior incidência de infeções por enterococos multirresistentes em pessoas e animais, projetou-se o estudo agora apresentado, que pretende contribuir para a elucidação do papel de enterococos da cavidade oral de cães com doença periodontal no aparecimento de endocardites bacterianas. Com base na hipótese de que, à semelhança do que acontece na medicina humana, a doença periodontal pode estar na origem de risco acrescido para o aparecimento de doenças sistémicas e, tendo em conta que é a doença infecciosa mais comum na população canina, foi então realizado este estudo. O objetivo foi analisar a possível relação entre a doença periodontal e endocardites bacterianas em cães, através da identificação molecular de enterococos na boca e coração dos pacientes, com posterior análise das resistências a antimicrobianos e pesquisa de fatores de virulência dos isolados obtidos.

O fato de muitos médicos veterinários e de os donos de cães geriátricos em Portugal associarem o mal-estar e prostração dos animais à idade avançada dos mesmos, quando pode existir outra causa subjacente que não identificada conduz a um diagnóstico incorreto, contribuiu também para a elaboração do objetivo deste estudo. Com o evoluir desta ideia foi também ponderado o possível risco zoonótico associado à doença periodontal, que deve ser tido em conta dada a cada vez maior proximidade do Homem com os animais de companhia.

### 2. Material e métodos

#### 2.1. Critérios de inclusão

Foram abrangidos neste estudo cadáveres da espécie canina diagnosticados com doença periodontal em diferentes graus, que tenham sofrido morte natural ou eutanásia por causas variadas. A amostragem foi constituída por cães a partir dos 7 anos de idade da clínica veterinária *AlcabidecheVet*, não sendo a raça nem as doenças concomitantes considerados como critérios de exclusão. Assim, qualquer cão com doença periodontal e mais de 7 anos que se apresentasse em condições aceitáveis na altura da necrópsia, isto é, sem sinais de putrefação, foram incluídos no trabalho experimental.

#### 2.2. Recolha de amostras

As amostras recolhidas incluíram o coração, para posterior análise histopatológica de forma a verificar se existia infeção das válvulas mitral e tricúspide (resultados não apresentados) e

zaragatoas com meio de transporte Stuart (Deltalab®) dessas mesmas válvulas e da gengiva de cada um dos animais, para pesquisa de *Enterococcus* spp.

Em cada cadáver foi feita uma observação detalhada da cavidade oral, para fazer estadiamento da doença periodontal. De seguida foi realizado um esfregaço com zaragatoa nos locais com lesões de doença periodontal (gengivite ou periodontite) e o respetivo registo fotográfico. Para remoção do coração foi feita uma incisão a nível torácico, de forma a permitir também uma boa observação dos órgãos mediastínicos e eventual deteção de alterações dos mesmos. O corte do coração foi efetuado com material estéril (luvas, pinça e tesoura) e posteriormente foi efetuado esfregaço com zaragatoa nas válvulas cardíacas. Foi ainda feita uma incisão abdominal para palpação e observação dos órgãos abdominais e inguinais para descartar possíveis alterações nos mesmos.

As amostras de coração para análise histopatológica foram conservadas em formol tamponado a 10% e transportadas para o Laboratório de Anatomia Patológica da FMV – ULisboa (resultados não apresentados); as zaragatoas para isolamento bacteriano foram conservadas a 5°C e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da FMV – ULisboa, onde foram processadas.

Tendo em conta o reduzido tamanho da amostra<sup>2</sup> foi usado o teste exato de Fisher para calcular a probabilidade de associação entre o género, a idade, a raça, o porte, a ocorrência de destartarização em vida e o estadio de doença periodontal, ou seja, a probabilidade de tais características serem independentes (Zar, 1996).

### 2.3. Processamento de amostras e isolamento de *Enterococcus* spp.

Com o objetivo de verificar a presença de bactérias do género *Enterococcus* nas amostras de cada animal, as zaragatoas foram semeadas pelo método de estria em Slanetz and Bartley Agar (SBA) + cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Liofilchem®), um meio de cultura seletivo para o género *Enterococcus*, e também em SBA suplementado com vancomicina (10 µg/ml), para investigar a possível presença de enterococos resistentes a este agente antimicrobiano. As amostras foram ainda inoculadas em Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Difco™ Laboratories) líquido (passo de enriquecimento), seguidas de incubação a 37°C durante 24 a 48 horas, com o objetivo de promover o crescimento das bactérias presentes nas zaragatoas, mesmo nas situações em que estas possam estar presentes em número demasiado reduzido, *stressadas* ou que tenham sido submetidas a antimicrobianos, não crescendo no meio seletivo.

Após incubação das placas de SBA e SBA suplementado com vancomicina a 42°C durante 24 a 48 horas, analisaram-se as mesmas para detetar crescimento bacteriano. Nas situações

---

<sup>2</sup> De modo geral usa-se o Teste exato de Fisher quando o valor de  $N < 20$  ou  $20 < N < 40$  e a menor frequência esperada for menor que 5, uma vez que este teste produz erro menor que o teste de Qui Quadrado (Zar, 1996).

em que se observaram colónias características (rosa a vermelho escuro) selecionaram-se um máximo de quatro, que foram submetidas a dois passos de purificação em meio seletivo. Sempre que não se detetou qualquer crescimento recorreu-se às zaragatoas colocadas em BHI (enriquecimento), procedendo-se à sementeira por estria das mesmas em SBA.

## 2.4. Identificação ao nível de género

### 2.4.1. Métodos fenotípicos

Por forma a fazer uma identificação provável a nível do género foram realizados os testes de catalase e oxidase, coloração Gram e avaliação da capacidade de hidrólise da esculina em meio biliar esculina azida agar (Sharlau Microbiology®) (adaptado de Vos et al., 2009). Os isolados catalase e oxidase negativos, Gram positivos e hidrólise da esculina positivos foram conservados em duplicado em meio BHI líquido com 20% (v/v) de glicerol a -20 °C. Adicionalmente, foram conservados 0,9 mL de cada um dos BHI líquidos inoculados no início deste trabalho, tendo-se acrescentado 40% (v/v) de glicerol aos mesmos, mantendo-os igualmente a -20°C.

### 2.4.2. Métodos moleculares

Para confirmação da identificação ao nível do género, procedeu-se à extração de DNA dos isolados em estudo pelo método de fervura na presença de Tween® 20 (0,1% de Tween em TBE (10mM:1mM), pH 8.0), tendo sido depois realizada uma centrifugação a 15000 rpm, 22°C, durante 5 minutos, para que fosse possível proceder a uma reação de amplificação por PCR (denominada Ent-PCR).

Os *primers* Ent1 (5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3') e Ent2 (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3') foram utilizados para amplificar uma região do rRNA 16S características deste género bacteriano. A reação de PCR foi realizada num aparelho MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) em tubos de 0,2 mL com 25 µL de mistura contendo Supreme NZYTaQ Green Master Mix® (Nzytech®) 1X, 0,5 µM de cada *primer* e 1 µL de DNA. As amostras foram sujeitas a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos para ocorrer desnaturação do DNA, 48°C para ocorrer o *annealing* durante 1 minuto e 72°C durante 45 segundos para atingir a temperatura ótima da Taq. Foi efetuado um ciclo de extensão final a 72°C durante 5 minutos, sendo as amostras de seguida arrefecidas a 4°C. Foram incluídos controlos negativo (DNA de *Staphylococcus*) e positivos (*E. faecalis* V583) (adaptado de Ke et al., 1999).

Após amplificação, foram analisados 9 µL de cada produto de PCR juntamente com 1 µL de GelStar® 10X (Lonza®) por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 0,5X a 120 V durante cerca de uma hora e trinta minutos. Foi adicionado um marcador de massa molecular (Ladder VI, Nzytech®) nas duas extremidades de cada gel.

Por último foi feito o registo fotográfico dos resultados, usando o sistema de imagem ImageMaster® VDS (GE Healthcare Life Sciences). Este procedimento foi seguido para todos os géis de agarose realizados ao longo do trabalho experimental.

## 2.5. Análise da diversidade

Foi realizada a tipificação dos isolados para posterior análise da diversidade utilizando a técnica de PCR-*fingerprinting*, tendo para isso sido utilizados em reações independentes os *primers* ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')/ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Valenzuela et al., 2012) e OPC19 (5'-GTTGCCAGCC-3') (adaptado de Ribeiro et al., 2011). A reação de PCR foi realizada num aparelho MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) em tubos de 0,2 mL com 25 µL de mistura contendo Supreme NZYTaQ Green Master Mix® (Nzytech®) 1X, 0,5 µM de cada *primer* e 1 µL de DNA. As amostras foram sujeitas a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 45 segundos para ocorrer desnaturação do DNA, 42°C para ocorrer o *annealing* durante 1 minuto e 72°C durante 90 segundos para atingir a temperatura ótima da Taq. Foi efetuado um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos, sendo as amostras arrefecidas a 4°C. Foram incluídas reações de controlo negativo (DNA de *Staphylococcus*) e positivo (*E. faecalis* V583) (adaptado de Ke et al., 1999).

Após amplificação, foram analisados 8 µL de cada produto de PCR juntamente com 2 µL de GelStar® 10X (Lonza®) por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X a 120 V durante cerca de 3 horas. Foi adicionado um marcador de massa molecular (Ladder VI, Nzytech®) nas duas extremidades de cada gel.

A análise dos perfis de bandas obtidos foi efetuada usando o programa BioNumerics (versão 6.6.2, Applied Maths NV, Kortrijk, Belgium), todos os perfis foram normalizados, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para análise de semelhança entre os perfis obtidos e foram construídos dendrogramas através do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). O nível de reprodutibilidade da técnica foi estimado pela realização de 5 – 10% de réplicas.

### 2.5.1. Análise de dados

Foram calculados os índices de diversidade de Simpson (D) (Hunter & Gaston, 1988) e de Shannon (H') (Zar, 1996) de forma a avaliar a diversidade intraespecífica. O índice de Simpson é geralmente interpretado como a possibilidade de dois organismos escolhidos ao acaso pertencerem ao mesmo grupo, enquanto o índice de Shannon mede o grau de incerteza associado à previsão do grupo a que pertence um determinado indivíduo, podendo também ser interpretado como uma medida de entropia/desordem presente nos agrupamentos. Estes índices são calculados de acordo com as Equações 1 e 2.



**Equação 1.** Índice de diversidade de Simpson.

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$

Legenda – S: número total de grupos formados; N: número total de isolados analisados;  $n_i$ : número de isolados do grupo i.

**Equação 2.** Índice de diversidade de Shannon.

$$H' = \sum_{i=1}^S P_i \times \ln(P_i)$$

Legenda – S: número total de grupos formados;  $P_i$ : proporção de isolados do grupo i em relação ao número total de isolados ( $P_i = n_i / N$ ).

Como o índice de Simpson é inversamente proporcional à diversidade, aplica-se o seu complementar ( $D' = 1 - D$ ) que se refere à probabilidade de dois organismos selecionados aleatoriamente pertencerem a grupos diferentes. Uma vez que se pretende analisar o grau de heterogeneidade da amostra, recorreu-se ao índice  $J'$ , derivado do índice de Shannon (Zar, 1996), calculado da seguinte forma (Equação 3):

**Equação 3.** Derivado do índice de Shannon.

$$J' = \frac{H'}{H_{\max.}} = \frac{H'}{\ln(S)}$$

Legenda – S: número total de grupos formados;  $H'$ : índice de diversidade de Shannon.

## 2.6. Identificação ao nível da espécie

Para identificação ao nível da espécie foram otimizadas reações de amplificação de PCR *multiplex* utilizando *primers* espécie-específicos. Os *primers* FM1 (5'-GAAAAACAATAGAAGAATTAT-3') / FM2 (5'-TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA-3') foram utilizados para identificar os isolados da espécie *E. faecalis*; os *primers* FL1 (5'-ACTTATGTGACTAACTTAACC-3') / FL2 (5'-TAATGGTGAATCTTGGTTTGG-3') foram utilizados para identificar os isolados da espécie *E. faecium*. A reação de PCR foi realizada num aparelho MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) em tubos de 0,2 mL com 25 µl de mistura contendo Supreme NZYTaq Green Master Mix® (Nzytech®) 1X, 1 µM de cada *primer* e 1 µL de DNA. As amostras foram sujeitas a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos para ocorrer desnaturação do DNA, 60°C para ocorrer o *annealing* durante 1 minuto e 72°C durante 45 segundos para atingir a temperatura ótima da Taq. Foi efetuado um ciclo de extensão final a 72°C durante 5 minutos, sendo as amostras de seguida arrefecidas a 4°C. Foram incluídos controlos positivos para *E. faecalis* (MMH594 e V583) e *E. faecium* (E300 e F10) (adaptado de Ke et al., 1999).

Após amplificação, foram analisados 8 µL de cada produto de PCR juntamente com 1 µL de GelStar® 10X (Lonza®) por eletroforese em gel de agarose a 1.2% em TBE 0,5X a 110 V durante cerca de uma hora. Foi adicionado um marcador de massa molecular (Ladder VI, Nzytech®) nas duas extremidades de cada gel.

## 2.7. Suscetibilidade a antimicrobianos - antibiogramas

A análise da suscetibilidade a um total de 10 agentes antimicrobianos usados em medicina veterinária e 8 usados em medicina humana (Tabela 3) foi feita pelo método de difusão em disco. Para isso efetuou-se uma suspensão com culturas puras num tubo com 5 ml de soluto fisiológico, de forma a obter uma turvação de 0,5 na escala de McFarland (concentração  $\approx 1,5 \times 10^8$  UFC/ml). De seguida inoculou-se a totalidade da superfície seca de uma placa de BHI (Difco™ Laboratories). Este processo foi repetido três vezes, rodando a placa aproximadamente 60° de forma a obter uma distribuição uniforme do inóculo pela sua superfície. Quando todo o inóculo tinha sido absorvido, colocaram-se os discos impregnados com os antimicrobianos com o auxílio de uma pinça estéril, fazendo ligeira pressão no topo de cada disco de forma a assegurar um contacto completo com a superfície do meio de cultura. As placas foram então incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 horas, após as quais se procedeu à medição do diâmetro dos halos de inibição promovidos por cada antimicrobiano. Os diâmetros dos halos de inibição foram comparados com aqueles estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para medicina veterinária (2013) e para medicina humana (2013) (Anexo 1).

**Tabela 3.** Compostos antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade a antimicrobianos, respetivos alvos e classes.

Alvo	Classe	Antimicrobiano	Símbolo	Dose por disco (µg)	Uso
Inibição da síntese de proteínas	Aminoglicósidos	Gentamicina	CN	10 / 120	V / H
	Macrólidos	Eritromicina	E	15	V + H
	Lincosamidas	Clindamicina	DA	2	V + H
	Fenicóis	Cloranfenicol	C	30	V + H
	Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	V + H
Inibição da síntese da parede	$\beta$ -lactâmicos	Ampicilina	AMP	10	V + H
		Amoxicilina/Ácido clavulânico	AMC	20/10	V
	Carbapenemos	Imipenem	IMP	10	V
	Glicopéptidos	Vancomicina	VA	30	V + H
Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	V + H

Legenda – V: Antimicrobianos de uso em medicina veterinária; H: Antimicrobianos de uso em medicina humana.

Foi usado o teste exato de Fisher para calcular a probabilidade de associação entre a resistência a antimicrobianos de cada isolado e o local de onde foi recolhido o mesmo (Zar, 1996).

## 2.8. Fatores de virulência

### 2.8.1. Testes em placa

Para análise fenotípica de fatores de virulência recorreu-se a dois testes em placa com o objetivo de avaliar a produção de hemólise e de gelatinase. No primeiro foi usado o meio Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo (BioMerieux, Portugal), tendo-se procedido à inoculação por sementeira por estria e posterior incubação durante 48 horas a 37°C. Para o teste da gelatinase foi usado o meio Gelatine Peptone Agar (Liofilchem®), inoculado por sementeira por estria e incubado durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente foi adicionada ao meio uma solução de cloreto de mercúrio, para visualização de halos correspondentes à degradação da gelatina presente no meio.

### 2.8.2. Pesquisa de genes de virulência

A presença de genes envolvidos na virulência do género *Enterococcus* foi testada através da realização de três reações de PCR *multiplex* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Combinações de PCR *multiplex* usadas para determinar os fatores de virulência.

PCR	Produto	Gene	Sequência (5'-3')	Referência
Multiplex 1	Substância de agregação de enterococos	<i>agg</i>	5'-AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC-3' 5'-AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	(Eaton & Gasson, 2001)
	Citolisina	<i>cylA</i>	5'-TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA-3' 5'-CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG-3'	(Semedo, et al., 2003b)
	Gelatinase	<i>gelE</i>	5'-ACCCCGTATCATTGGTTT-3' 5'-ACGCATTGCTTTTCCATC-3'	(Eaton & Gasson, 2001)
	Proteína de superfície	<i>esp</i>	5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3' 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	(Eaton & Gasson, 2001)
Multiplex 2	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecium</i>	<i>efaA<sub>fm</sub></i>	5'-AACAGATCCGCATGAATA-3' 5'-CATTTTCATCATCTGATAGTA-3'	(Eaton & Gasson, 2001)
	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecalis</i>	<i>efaA<sub>fs</sub></i>	5'-GACAGACCCTCACGAATA-3' 5'-AGTTCATCATGCTGTAGTA-3'	(Eaton & Gasson, 2001)
Multiplex 3	Adesina de ligação ao colagénio da espécie <i>E. faecium</i>	<i>acm</i>	5'- CAGCTTCTGGTGGAGTCAACGG-3' 5'- GGTCGTTTGCCGTCTTGGTTC-3'	Lemsaddek, não publicado
	Adesina de ligação ao colagénio da espécie <i>E. faecalis</i>	<i>ace</i>	5'- AACAAATCAAGACGCAACGAATG-3' 5'- GGCGACACATGAACTTCTGGC-3'	Lemsaddek, não publicado
	Regulador de resposta ao stress da espécie <i>E. faecalis</i>	<i>gls24</i>	5'- TTCTAACGATTGATGGAGGCTT-3' 5'- TTTACGCGAGGTTTCAGTTTCTT-3'	(Nallaparedy, Wenxiang, Weinstock, & Murray, 2005)
	Fímbrias associadas a endocardite/formação de biofilme pela espécie <i>E. faecalis</i>	<i>ebpA</i>	5'-TCCATTTGCAGAAGCAAGAATG-3' 5'-CCDSMZGCCTCTGTTTGAAGTC-3'	(Santos, 2011)
Multiplex 4		<i>ebpB</i>	5'-GCATTAGCAGAGGCATCGCAAG-3' 5'-CACCGGTTTCTGCTAATTGACG-3'	(Santos, 2011)
		<i>ebpC</i>	5'-CGGCACAGCTCGTGATTAC-3' 5'-CGCCACCACCATATTCGTAGC-3'	(Santos, 2011)

As reações de PCR foram realizadas num aparelho MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) em tubos de 0,2 mL com 25 µL de mistura contendo Supreme NZYtaq Green Master Mix® (Nzytech®) 1X, 1 µM de cada *primer* e 1 µL de DNA. As amostras foram sujeitas a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos para ocorrer desnaturação do DNA, 55°C para ocorrer o *annealing* durante 1 minuto e 72°C durante 45 segundos para atingir a temperatura ótima da Taq. Foi efetuado um ciclo de extensão final a 72°C durante 5 minutos, sendo as amostras de seguida arrefecidas a 4°C. Foram incluídos controlos positivos para as espécies *E. faecalis* (MMH594 e V583) e *E. faecium* (E300 e F10) (adaptado de Ke et al., 1999).

Após amplificação, foram analisados 8 µL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 µL de GelStar® 10X (Lonza®) por eletroforese em gel de agarose a 1.2% em TBE 0,5X a 110 V durante cerca de uma hora. Foi adicionado um marcador de massa molecular (Ladder VI, Nzytech®) nas duas extremidades de cada gel.

Foi usado o teste exato de Fisher para calcular a probabilidade de associação entre os fatores de virulência de cada isolado e o local de onde foi recolhido o mesmo, ou seja, a probabilidade de tais características serem independentes (Zar, 1996).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Recolha de amostras

As amostras foram colhidas de 32 cadáveres da espécie canina (17 machos e 14 fêmeas, com idades compreendidas entre 7 e 17 anos) diagnosticados com doença periodontal em diferentes graus, que tenham sofrido morte natural ou eutanásia.

Espécies de enterococos fazem parte da microbiota gastrointestinal do Homem e de outros animais, podendo porém ser encontrados em diversos órgãos (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Por essa mesma razão, a técnica de necropsia foi sempre efetuada controlando possíveis contaminações, tendo para isso sido sempre usado material estéril, nomeadamente pinças, luvas, tesouras e bisturi. Além disso, uma vez que após a morte ocorrem fenómenos de autólise, as necropsias foram realizadas num máximo de 15 minutos após a morte do animal, antes da ocorrência da rigidez cadavérica, em ambiente com temperaturas de cerca de 20°C, sem exposição à luz solar. Em geral, a putrefação inicia-se depois do fim da rigidez cadavérica, ocorrendo entre a 6ª e a 36ª hora *post-mortem*. Esse período depende de fatores como a temperatura ambiente, grau de humidade, higiene dos locais e fatores intrínsecos aos animais (se foi feita sangria ou não, tratamento em vida com antimicrobianos, doenças que produzem fortes perdas de líquidos, morte rápida ou por asfixia, doenças toxémicas e septicémicas e idade e estado de nutrição) (Silva, 2009).

Na tentativa de avaliar a presença de bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* na boca e coração de cães, foram recolhidas um total de 64 amostras, a partir de cães com idades compreendidas entre os 7 e os 17 anos de idade com doença periodontal. Foi dada preferência a este intervalo de idades de forma a se obter uma amostragem mais homogénea e tendo em conta que existe maior probabilidade de ocorrer doença periodontal e doença cardíaca a partir dessas idades. Também o facto de muitas vezes a conclusão em relação à causa da sua morte dos animais geriátricos ser pouco precisa foi um dos motivos para selecionar cães a partir dos 7 anos de idade, focando assim o estudo nesta população. Existem muitas opiniões em relação à altura em que os cães atingem a idade sénior, estando a mesma dependente de fatores com a raça, genética, nutrição e ambiente em que o cão vive. Considerou-se como regra que a partir dos 7 anos os cães começam a estar em risco de ter os chamados problemas relacionados com o envelhecimento, tornando-se necessário ponderar um acompanhamento veterinário mais regular de forma a identificar doenças em estádios iniciais (Laflamme, 2005).

Informação relevante referente a cada animal pode ser consultada na Tabela 5, tendo sido registados os seus dados de identificação, o estadio de doença periodontal observado à altura da morte, bem como os achados de necrópsia.

**Tabela 5.** Identificação e dados relevantes de cada indivíduo da amostragem.

Código	Género	Idade (anos)	Raça	Porte*	Destartarização em vida	Estadio de DP
A	F	7	SRD	Pequeno	N	Periodontite moderada
B	M	13	SRD	Médio	N	Periodontite ligeira
C	F	17	x Pequinês	Miniatura	N	Periodontite grave
D	F	7	Boxer	Grande	N	Gengivite
E	M	10	SRD	Pequeno	N	Periodontite ligeira
F	M	17	SRD	Pequeno	N	Periodontite moderada
G	M	17	SRD	Médio	N	Periodontite moderada
H	F	13	SRD	Médio	N	Periodontite moderada
I	M	16	x Caniche	Pequeno	N	Periodontite grave
J	F	13	SRD	Pequeno	N	Periodontite ligeira
K	F	9	Husky	Grande	N	Periodontite ligeira
L	F	15	Retriever do Labrador	Grande	N	Gengivite
M	F	15	SRD	Miniatura	N	Periodontite ligeira
N	F	14	SRD	Médio	N	Periodontite ligeira
O	M	13	Retriever do Labrador	Grande	N	Periodontite grave
P	M	12	Retriever do Labrador	Grande	N	Periodontite grave
Q	M	14	Yorkshire Terrier	Miniatura	S (2008)	Periodontite grave
R	F	14	SRD	Pequeno	N	Periodontite grave
S	M	8	Pastor Alemão	Grande	N	Periodontite ligeira
T	M	12	SRD	Grande	N	Periodontite ligeira
U	F	7	SRD	Médio	N	Periodontite ligeira
V	M	16	Teckel	Pequeno	N	Periodontite moderada
W	M	17	SRD	Grande	N	Periodontite moderada
X	F	9	Boxer	Grande	N	Periodontite ligeira
Y	F	14	SRD	Miniatura	N	Periodontite moderada

**Tabela 5 (continuação).** Identificação e dados relevantes de cada cão da amostragem.

Z	M	10	Basset Hound	Médio	N	Periodontite ligeira
AA	M	12	SRD	Grande	N	Periodontite ligeira
AB	M	12	SRD	Pequeno	N	Periodontite ligeira
AC	M	14	x Caniche	Pequeno	N	Periodontite moderada
AD	M	12	Retriever do Labrador	Grande	N	Gengivite
AE	M	7	SRD	Pequeno	N	Periodontite ligeira
AF	F	12	SRD	Pequeno	N	Periodontite grave

Legenda – M: Macho; F: Fêmea; SRD: Sem raça definida; N: Não; S: Sim; \*: Porte baseado no peso do animal, segundo Grandjean & Haymann (2012).

Dos 32 animais em estudo, 56% (18/32) eram machos e 44% (14/32) fêmeas. Foi incluída uma grande variedade de raças, existindo cerca de 56% (18/32) de cães sem raça definida. Não foram incluídos cães de porte gigante, uma vez que não foram registadas mortes destes animais na clínica em questão no período de duração do estudo. Os portes mais predominantemente observados foram o pequeno e o grande, constituindo ambos 34% (11/32) dos casos. O estadio de doença periodontal observado mais frequentemente foi o ligeiro, sendo o caso de 44% (14/32) dos cães observados, seguido do moderado, com 25% (8/32) e do grave com 22% (7/32), o estadio menos observado foi o de gengivite, fazendo parte de apenas 9% (3/32) dos casos. Em apenas um dos indivíduos tinha sido realizada destartarização em vida, sendo por isso uma informação pouco relevante para este estudo. No Anexo 2 é possível consultar as prevalências de cada uma das variáveis referidas. Pelo cálculo da probabilidade de associação das variáveis acima mencionadas, através do teste exato de Fisher, não foi notada relação entre nenhum dos fatores acima referidos (Anexo 3), sendo que para a estudar mais detalhadamente seria necessário realizar uma amostragem maior e mais homogênea, escolhendo cães da mesma raça com elevada predominância de doença periodontal, como é o caso dos caniches (Hoskins, 2004; Pavlica, et al., 2008).

### 3.2. Processamento das amostras e isolamento

Na fase de isolamento foi atribuído um código a cada uma das amostras para facilitar a sua identificação, sendo este código composto pelas letras EZ (*Enterococcus Zaragatoa*), seguida da letra C ou B, conforme a proveniência fosse o coração (C) ou a boca (B), e do número do animal (1 corresponde ao animal A, 2 corresponde ao animal B e por aí em diante).

O meio seletivo de eleição foi o SBA, visto ser o recomendando pela norma Europeia ISO 7899-2 (Anónimo, 2000) para a deteção e enumeração de enterococos. Este meio contém triptose que, por ser produzida a partir da hidrólise enzimática de uma mistura que contém

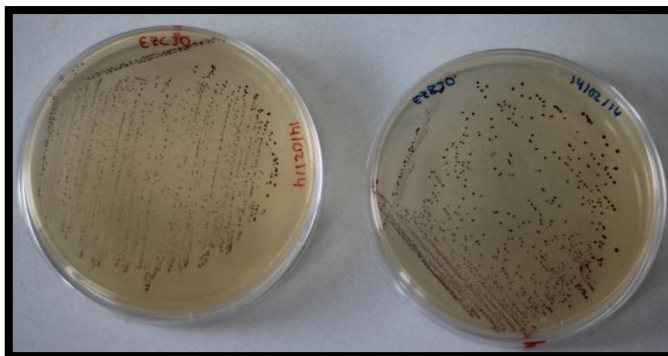
carne, leveduras e caseína, assegura os nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano; glucose como fonte de energia; extrato de levedura como fonte de aminoácidos e vitaminas do grupo D; azida de sódio que inibe o crescimento de bactérias de Gram negativo e estafilococos; lecitina e *tween* 80 que eliminam a atividade bactericida dos desinfetantes e antissépticos mais comumente usados na sanificação (compostos de amónio quaternário, derivados fenólicos, hexaclorofeno, formaldeído e etanol); e TTC que é o corante usado como indicador de crescimento bacteriano, sendo reduzido a formazano no interior das células de enterococos, resultando na produção de colónias de cor vermelha (Leite, 2011).

Tendo em conta a dependência de alguns enterococos à vancomicina, isto é, determinadas estirpes de enterococos só crescem na presença deste antimicrobiano (Koneman et al., 2007), foi adicionalmente usado meio SBA suplementado com 10 µg/mL de vancomicina.

As colónias com coloração vermelha foram então consideradas como prováveis enterococos (Figura 4). Desta forma, das amostras recolhidas, observou-se crescimento característico em cerca de 61% (39/64), provenientes do isolamento em SBA, não tendo sido observado qualquer crescimento nas placas de SBA suplementado com vancomicina. É ainda de salientar que em cerca de 18% (7/39) das amostras apenas foi observado crescimento característico após o passo de enriquecimento em BHI, o que significa que o número de enterococos presentes na amostra inicial era muito reduzido. O BHI é um meio de cultura nutritivo de utilização geral, utilizado para cultura de uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias a partir de inúmeros materiais clínicos e não clínicos (MacFaddin, 1985).

As diferenças no crescimento observado em SBA e SBA com vancomicina eram de certa forma esperadas, uma vez que a vancomicina inibe o crescimento bacteriano. Porém, a administração indevida e abusiva desse agente antimicrobiano é considerado um fator importante para o desenvolvimento de resistência a estes compostos (Sayah et al., 2005). O uso deste segundo meio foi então feito com o intuito de procurar enterococos provenientes do contacto das pessoas com os cães, uma vez que não são efetuados tratamentos com vancomicina em animais de companhia.

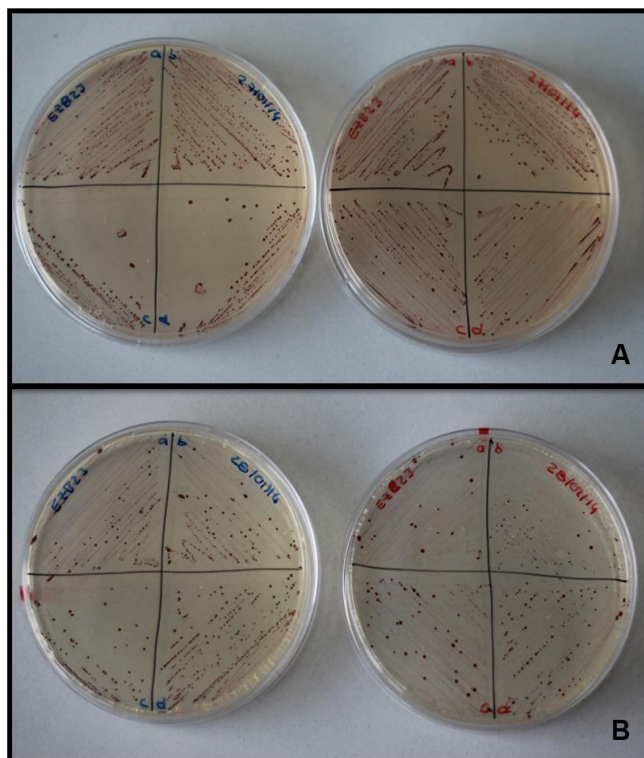
**Figura 4.** Colónias características do género *Enterococcus* provenientes das amostras EZC30 (à esquerda) e EZB30 (à direita) (fotografia gentilmente cedida por Catarina Arranja).





De seguida, de acordo com diferenças morfológicas observadas nas colónias obtidas em SBA, foram selecionadas até um máximo de quatro colónias características a partir de cada amostra, na tentativa de obter uma seleção representativa da diversidade observada, perfazendo um total de 156 culturas bacterianas. Essas colónias foram de seguida sujeitas a dois passos de purificação sucessivos com o intuito de garantir a sua pureza (Figura 5).

**Figura 5.** Primeira (A) e segunda (B) purificação das amostras EZB23 (à esquerda da figura A e B) e EZC23 (à direita da figura A e B) (fotografia gentilmente cedida por Catarina Arranja).

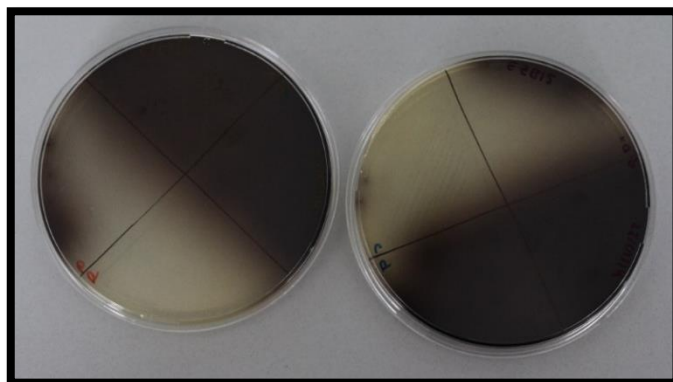


### 3.3. Identificação ao nível de género

#### 3.3.1. Métodos fenotípicos

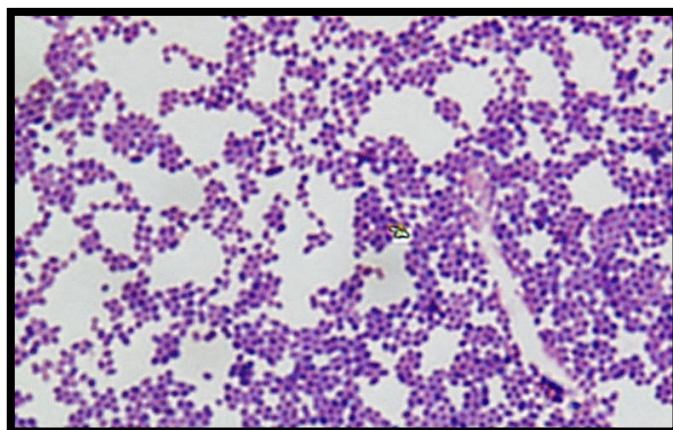
Para confirmar que as colónias características correspondiam de facto a bactérias do género *Enterococcus*, todos os isolados foram semeados em bÍlis esculina azida agar (Sharlau Microbiology®), uma vez que os membros deste género têm a capacidade de hidrolisar a esculina em esculetina e dextrose. A esculetina reage com o citrato férrico formando um visível complexo castanho muito escuro à volta do crescimento bacteriano. Na Figura 6 é possível observar que todos os isolados da amostra EZC15 (à esquerda) são positivos para a hidrólise da esculina, à exceção do d; em relação à amostra EZB15 (à direita) todos os isolados são positivos para a hidrólise da esculina, com exceção do c. Por conseguinte, apenas os 117 isolados positivos para a hidrólise da esculina foram selecionados para passarem à fase seguinte deste estudo.

**Figura 6.** Crescimento de isolados em bÍlis esculina azida agar (fotografia gentilmente cedida por Catarina Arranja).



Para confirmação adicional ao nível de género foram avaliadas características gerais deste grupo bacteriano, tendo os isolados sido sujeitos a coloração de Gram e testes de catalase e oxidase. Todos mostraram ser de Gram positivo, observando-se bactérias de cor azul (Figura 7), e catalase e oxidase negativos, sendo classificados como prováveis *Enterococcus* spp.

**Figura 7.** Coloração Gram da amostra EZB8a (ampliação 1000X).

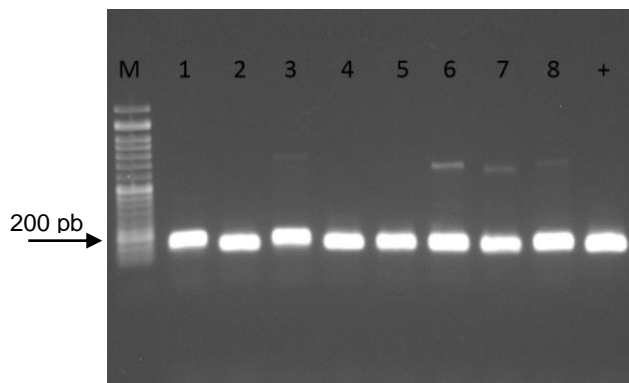


### 3.3.2. Métodos moleculares

Para monitorizar a frequência de infeção por enterococos no coração e gengiva de cães, a sua identificação molecular revela-se de grande importância. Apesar de os métodos fenotípicos permitirem um despiste inicial de isolados bastante assertivo, a utilização de métodos moleculares torna o diagnóstico destas infeções mais fácil, rápido e fiável, transmitindo assim mais segurança. Os métodos moleculares baseados na amplificação do DNA por PCR apresentam uma grande vantagem, uma vez que são necessárias quantidades reduzidas de DNA (Mochizuki, Sugie, & Uehara, 1997). No presente estudo, aplicaram-se diversas metodologias moleculares, baseadas na amplificação por PCR, com o objetivo de verificar a presença de enterococos de diferentes origens.

Assim, a identificação fenotípica provável foi confirmada através de uma reação de amplificação por PCR (Ent-PCR) (Figura 8), sendo que a metodologia seguida foi adaptada da descrita por Ke et al. (1999).

**Figura 8.** Ent-PCR das amostras 1 a 8.



Legenda – M: Marcador; +: Controlo positivo.

Com a aplicação da técnica de Ent-PCR, um total de 117 isolados, provenientes de 34 amostras, foram identificados como pertencendo ao género *Enterococcus*. Todos os isolados eram provenientes do meio SBA, sendo que 21 amostras eram provenientes da gengiva e 13 do coração. Pela análise dos resultados obtidos comprova-se que estes microrganismos se encontram presentes tanto nas gengivas como no coração dos cães estudados, visto a sua presença ter sido detetada em mais de 50% (35/64) das amostras recolhidas.

Dos tecidos em estudo aquele que apresentou uma maior percentagem de amostras positivas para enterococos foi a gengiva com cerca 66% (21/32) de positividade, em comparação com cerca de 44% (14/32) de amostras de coração positivas. Uma vez que todos os animais em estudo apresentavam doença periodontal e que entre os agentes comumente presentes na gengiva desses animais estão os membros do género *Enterococcus* spp., a percentagem de amostras deste tecido com esta bactéria era de certa forma esperada. Na opinião da autora, estes valores tornam-se, porém, alarmantes, já que o contacto dos animais domésticos com o Homem é cada vez mais próximo, podendo ocorrer contágio devido a esta proximidade. Torna-se assim realmente importante que os donos dos cães adotem conhecimento deste facto, para que tomem as medidas de higienização da cavidade oral dos seus animais de forma assídua e desde cedo, prevenindo assim da melhor forma a ocorrência de doença periodontal. É também importante referir que a destartarização deve ser tida como uma medida profilática tal como a vacinação e desparasitação, uma vez que a escovagem diária dos dentes nem sempre é suficiente para prevenir o aparecimento desta doença (Hoskins, 2004; Crossley, 2005; Lobprise, 2012).

Em relação à percentagem de corações positivos para enterococos, não há estudos anteriores disponíveis que permitam aferir se está dentro dos valores esperados, mas tendo em conta que a grande maioria dos animais positivos não apresentava quaisquer sinais de doença

cardíaca em vida, é uma surpresa observar que cerca de 45% deles poderia ter endocardite bacteriana não diagnosticada, até porque este é uma afeção pouco diagnosticada em canídeos. Uma vez que a endocardite causa deterioração da qualidade de vida dos cães, este torna-se apenas um exemplo dos problemas que podem estar por trás da “doença” que é a velhice.

### 3.4. Análise da diversidade

Existindo a possibilidade de alguns dos isolados serem clones, uma vez que a partir de cada amostra/placa de isolamento foram retiradas quatro colónias para posterior identificação, o objetivo seguinte foi eliminá-los e selecionar apenas representantes da diversidade presente na amostra. Para tal, procedeu-se à tipificação dos 117 isolados por aplicação da técnica de *PCR-fingerprinting*, recorrendo a *primers* dirigidos para sequências repetidas no genoma, como o OPC19 e ERIC-1/ERIC-2. A utilização de *primers* dirigidos a sequências repetidas é uma das mais populares técnicas de análise genómica usada para detetar diferenças em genomas bacterianos, tendo a vantagem de ser rápida, barata e fácil de executar. Recorrer a dois *primers* distintos, dirigidos para diferentes sequências do genoma, permite uma análise mais abrangente do mesmo, proporcionando um maior entendimento das relações de semelhança entre os isolados da coleção (Guarro, Gene, & Stchigel, 1999).

Assim, com a finalidade de tipificar os isolados de enterococos incluídos na coleção utilizaram-se em reações de PCR os *primers* referidos (OPC19 e ERIC-1/ERIC-2). Os perfis evidenciaram variabilidade intraespecífica, observada sob a forma de ausência de fragmentos em alguns isolados e sua presença noutros ou sob a forma de diferenças na intensidade de alguns fragmentos presentes em todos os isolados. Esses resultados apontam para o poder discriminativo da metodologia aplicada uma vez que foi possível detetar variabilidade entre isolados do mesmo género.

Recorrendo ao *software* BioNumerics (versão 6.6.2, Applied Maths NV, Kortrijk, Belgium) os géis foram analisados, o que permitiu a construção de dendrogramas com base nas semelhanças entre os perfis de *PCR-fingerprinting* de todos os isolados, com o intuito de avaliar a diversidade microbiana da coleção em estudo. Assim, foi utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average*) para avaliar as relações de semelhança entre os vários isolados.

Em primeiro lugar estimou-se a reprodutibilidade da técnica procedendo-se à construção de um dendrograma que incluiu os isolados e os 5-10% de réplicas. A análise comparativa dos perfis evidenciou que com os *primers* OPC19 e ERIC-1/ERIC-2 obteve-se uma reprodutibilidade relativamente elevada, sendo de 80,5% para o primeiro *primer* e de 91,38% para o segundo. As diferenças observadas entre isolados e respetivas réplicas podem ser devido a pequenas diferenças de temperatura da reação de PCR, alterações na razão

DNA:*primer* ou na concentração de cloreto de magnésio. Outras variações podem ter acontecido devido à modificação do lote da *Taq* DNA polimerase usado (Soll, 2000).

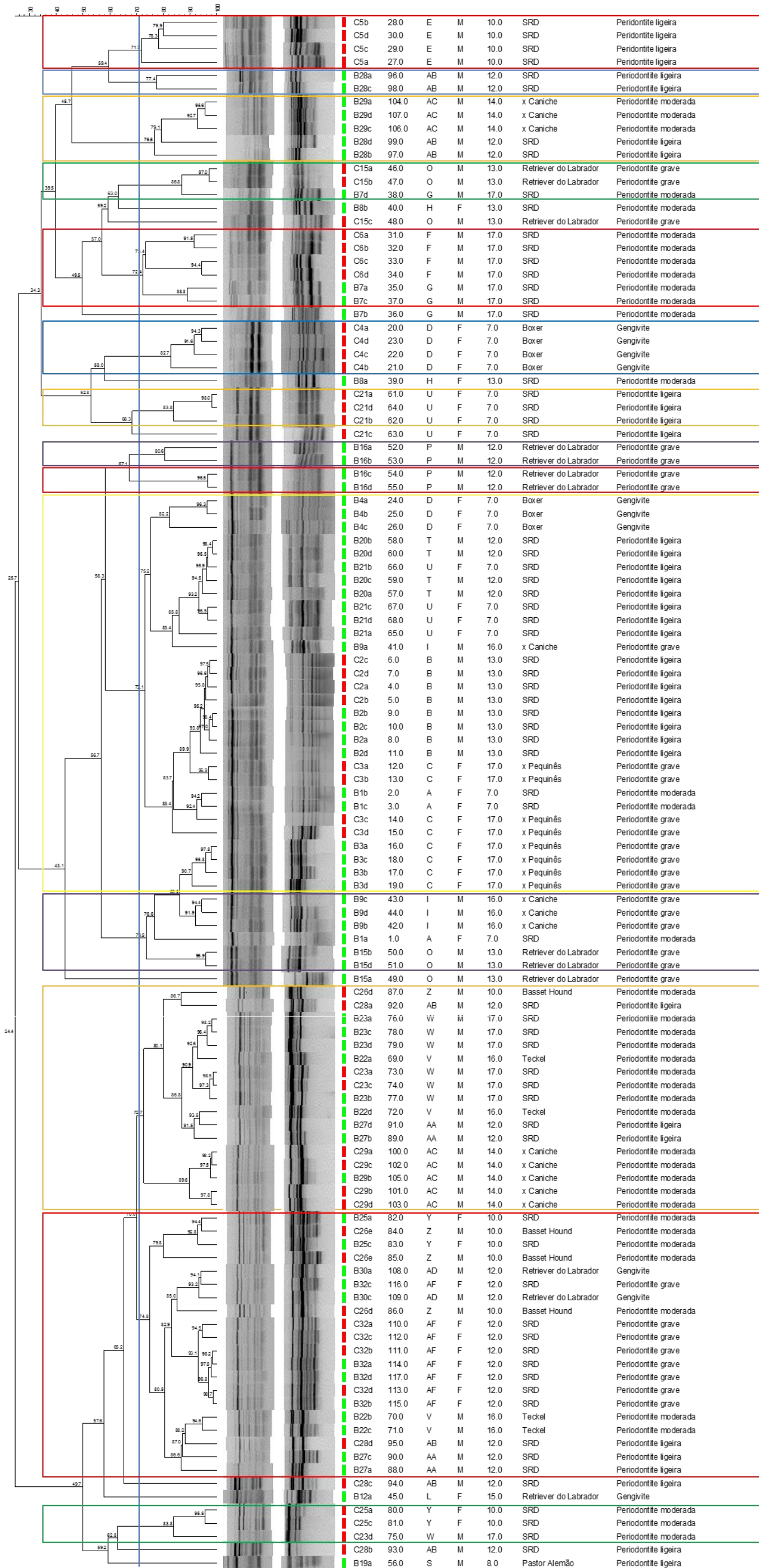
Seguidamente construiu-se um dendrograma englobando os perfis de bandas obtidos com ambos os *primers* (Figura 9). Nesta análise conjunta dos resultados obtidos com os dois *primers*, a linha de corte considerada para a definição de *clusters* (grupos de semelhança genómica) foi feita caso a caso por análise visual dos agrupamentos criados, optando-se por um nível de corte (*cut-off value*) de 71%. Assim, isolados que apresentam semelhança igual ou superior a esse valor foram considerados iguais ou extremamente semelhantes, numa abordagem que se denomina conservativa (*i.e.* os isolados são considerados iguais até prova inequívoca em contrário). A análise dos perfis de *fingerprint* permitiu reconhecer padrões de fragmentos presentes em mais de um dos isolados em estudo, tendo levado à seleção de 24 “tipos-genómicos” (Figura 9).

Após o traçar da linha de corte e de definidos os grupos genómicos, foram calculados os índices de diversidade de Simpson ( $D'$ ) e de Shannon-Weaver ( $J'$ ), para melhor avaliar a diversidade dos isolados em análise. Considerando o valor de 71% de semelhança para definição de “tipos-genómicos”, obtiveram-se os valores de 0,88 e 0,79, respetivamente.

O índice de Simpson baseia-se no número de tipos e isolados de cada tipo e mede a probabilidade de selecionar aleatoriamente dois indivíduos de duas estirpes não relacionadas, tiradas de uma população teste, e estes pertencerem ao mesmo grupo genómico. Por sua vez, o índice de Shannon-Weaver é uma medida de equidade, expressando a diversidade observada e refletindo a homogeneidade/heterogeneidade da distribuição dos isolados. Esses índices de diversidade são muito úteis, uma vez que o índice de Simpson estima a distinção entre os isolados enquanto o índice de Shannon-Weaver, como indicador da equidade, constitui uma medida fiável da homogeneidade da distribuição dos isolados pelos diferentes tipos (Hunter & Gaston, 1988; Zar, 1996).

Relativamente ao índice de Simpson, o valor obtido ( $D' = 0,88$ ) indica a elevada diversidade da coleção microbiana em estudo, uma vez que se dois isolados forem extraídos de uma população teste a probabilidade de pertencerem a dois tipos diferentes é elevada (88%). Considera-se então que a metodologia utilizada na fase de isolamento bacteriano permitiu recuperar grande parte da diversidade presente na amostra em estudo, pois levou ao isolamento de enterococos genomicamente distintos. Relativamente ao índice de Shannon-Weaver, o seu princípio é o mesmo, tendo porém em conta a diversidade máxima ( $H'_{\text{máx}}$ ) e portanto, a sensibilidade da análise aumenta visto que é considerado um máximo possível e o que se pretende é ver qual a diversidade observada face a esse máximo. A diversidade foi de 0,79 o que reforçou o facto de a amostragem ter permitido isolar indivíduos genomicamente distintos, indicando ainda que os “tipos-genómicos” não estão distribuídos de uma forma homogénea, isto é, alguns são mais frequentes que outros, tal como seria esperado que ocorresse *in vivo*.





**Figura 9.** Dendrograma baseado nos perfis de PCR-*fingerprinting* obtidos para os enterococos em estudo, construído utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

### 3.5. Identificação ao nível da espécie

Dos dois locais de amostragem, um total de 46 isolados foram selecionados como representantes da diversidade presente na amostragem inicial, incluindo 20 isolados da gengiva e 26 do coração.

Tal como a tipificação de estirpes, a identificação ao nível de espécie é importante para a avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (Riboldi, Mattos, Frazzon, Alves d'Azevedo, & Frazzon, 2008). Desta forma, na tentativa de identificar as espécies presentes nas amostras em análise, foram realizadas reações de PCR espécie-específico, para a identificação de algumas das espécies mais comuns, como *E. faecalis* e *E. faecium*.

Dos 46 isolados selecionados, cerca de 81% (37/46) foram identificados como pertencentes à espécie *E. faecalis*, cerca de 15% (7/46) como pertencentes à espécie *E. faecium* e cerca de 4% (2/46) permaneceram como *Enterococcus* sp., visto não pertencerem a nenhuma das espécies pesquisadas por PCR.

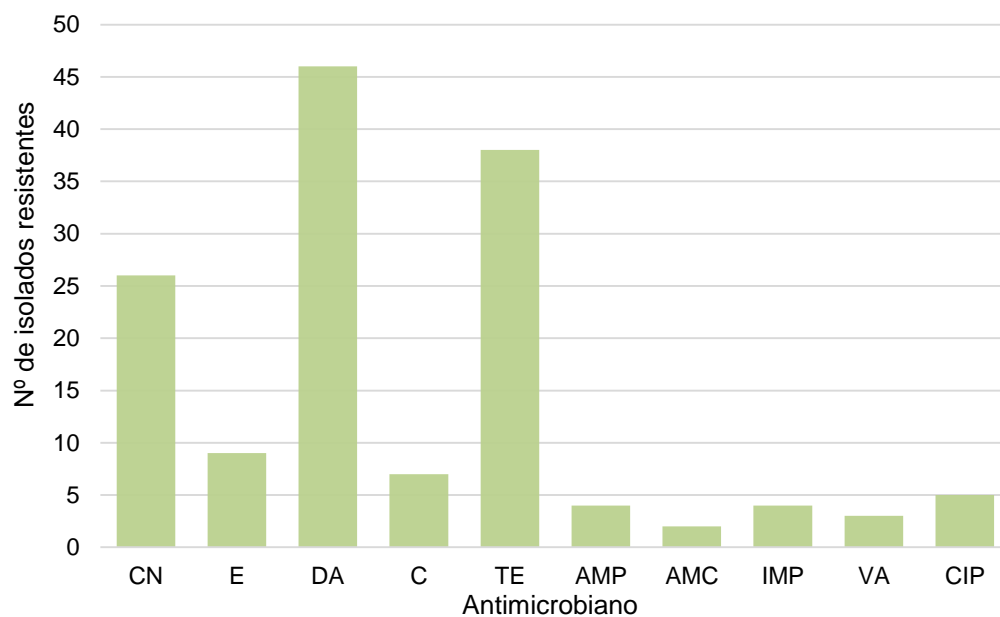
Tal como o reportado por outros autores, as espécies predominantes em isolados clínicos de várias origens são *E. faecalis* seguida de *E. faecium* (Kataoka, Umino, Ochi, Harada, & Sawada, 2014). Os dois isolados não identificados ao nível de espécie poderão pertencer a espécies como *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, visto em estudos já levados a cabo estas estarem associadas a isolados de proveniência clínica (Kataoka, et al., 2014). Não obstante, para confirmar a existência destas espécies teriam de ser realizadas reações de amplificação, recorrendo a outros *primers* espécie-específicos.

### 3.6. Suscetibilidade a antimicrobianos – antibiogramas

Vários autores apontam a utilização indevida e por vezes abusiva de antimicrobianos com fins terapêuticos ou como promotores de crescimento como a causa mais provável para o problemático aumento de resistências em bactérias de origem humana e animal (Lopes, et al., 2005; Hwang, et al., 2009; Vignaroli, Zandri, Aquilanti, Pasquaroli, & Biavasco, 2011). Por conseguinte, através da realização de antibiogramas foi avaliada a suscetibilidade dos isolados em estudo a 10 agentes antimicrobianos usados em medicina veterinária e 8 usados em medicina humana, uma vez que a doença periodontal tem um potencial risco para a saúde pública, tal como referido anteriormente. O perfil de resistência a antimicrobianos dos 46 isolados testados encontra-se esquematizado nas Figuras 10 e 11.

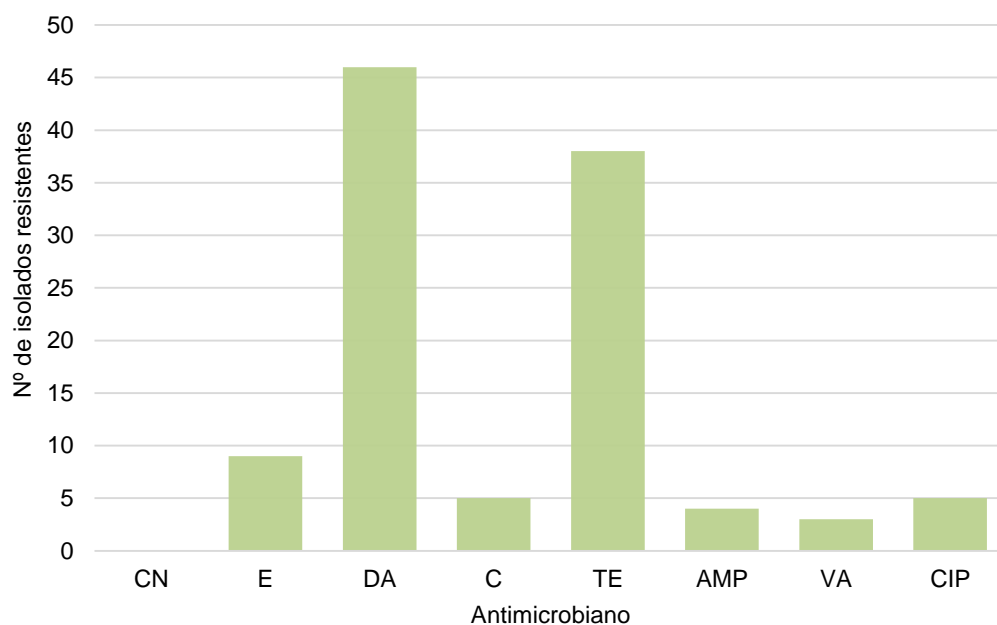


**Figura 10.** Perfil de resistência a antimicrobianos usados em medicina veterinária observado nos 46 isolados de *Enterococcus* representantes da coleção em estudo.



Legenda – CN: Gentamicina; E: Eritromicina; DA: Clindamicina; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; IMP: Imipenem; VA: Vancomicina; CIP: Ciprofloxacina.

**Figura 11.** Perfil de resistência a antimicrobianos usados em medicina humana observado nos 46 isolados de *Enterococcus* representantes da coleção em estudo.



Legenda – CN: Gentamicina; E: Eritromicina; DA: Clindamicina; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina; AMP: Ampicilina; VA: Vancomicina; CIP: Ciprofloxacina.

Segundo os intervalos de suscetibilidade definidos no CLSI (2013), quer para medicina veterinária quer para humana, 100% (46/46) dos isolados evidenciaram ser resistentes às lincosamidas (clindamicina). Relativamente aos restantes antimicrobianos testados, o imipenem e a amoxicilina com ácido clavulânico não têm resultados referentes a medicina humana, uma vez que não existem intervalos de suscetibilidade definidos para isolados com origem no Homem. Avaliando os valores padronizados para a medicina veterinária e a humana, com exceção do cloranfenicol, as percentagens de resistências observadas foram praticamente idênticas, tendo-se obtido os seguintes resultados: 83% (38/46) para a tetraciclina, 57% (26/46) para a gentamicina (não ocorreram resistências no caso da medicina humana), 20% (9/46) para a eritromicina, 15% (7/46) para o cloranfenicol (11% no caso da medicina humana), 11% (5/46) para a ciprofloxacina, 9% (4/46) para o imipenem, e 7% (3/46) para a vancomicina.

Os enterococos são descritos como sendo intrinsecamente resistentes a  $\beta$ -lactâmicos como a amoxicilina e a ampicilina (Lopes, et al., 2005). Contudo, apenas 9% (4/46) se mostrou resistente à ampicilina e 4% (2/46) à amoxicilina + ácido clavulânico. Resultados semelhantes foram reportados por Lopes et al. (2005).

No que diz respeito às resistências observadas para a tetraciclina e a gentamicina, Franz et al. (2001) e Valenzuela et al. (2009) referem que a resistência a estes agentes antimicrobianos têm sido mencionadas com elevada frequência entre isolados de enterococos de diferentes origens.

Para os restantes antimicrobianos testados, e cujas percentagens de resistência observadas foram inferiores a 40%, a sua comparação com outros estudos (Franz, et al., 2001; Valenzuela, et al., 2008; Tuncer, Ay, & Tuncer, 2013) permite verificar que em isolados de origem alimentar, percentagens de resistência semelhantes ou até mesmo superiores já foram reportadas. Não foram realizados estudos em enterococos isolados a partir de amostras clínicas de cães, sendo de suma importância para comparação com os resultados deste trabalho. Globalmente, esta ampla distribuição da resistência aos antimicrobianos por enterococos torna-se a cada dia uma crescente preocupação para a saúde pública.

O conceito de multirresistência considerado por Magiorakos et al. (2011), refere que para que um isolado seja considerado multirresistente deve ser resistente a pelo menos um antimicrobiano de três classes com alvos diferentes (Magiorakos, et al., 2011). Adotando este conceito verifica-se que nenhum dos isolados testados é multirresistente. A existência de estirpes multirresistentes poderia ser um dado indicativo de risco para a saúde pública, que seria agravado com os 54% de resistência à gentamicina que, de acordo com Moreno et al. (2006), é considerado um dos antimicrobianos mais importantes no tratamento de infeções por estirpes multirresistentes de enterococos. Porém, o facto de apenas 7% dos isolados se ter mostrado resistente à vancomicina, outro antimicrobiano usado no tratamento de infeções

por enterococos multirresistentes (Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, & Vuyst, 2006), é um dado positivo no que ao risco para a saúde pública diz respeito.

Adicionalmente, a capacidade que os enterococos têm em atuar como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos é igualmente uma preocupação crescente (Valenzuela, et al., 2012). Assim, teria sido de suma importância proceder à pesquisa de genes envolvidos nas resistências a antimicrobianos através da técnica de amplificação por PCR, com recurso a *primers* específicos.

Pelo cálculo da probabilidade de associação das resistências a antimicrobianos observadas em cada isolado e o local de recolha do mesmo, através do teste exato de Fisher, não foi notada relação entre nenhum desses fatores (Anexo 4).

### 3.7. Fatores de virulência

Uma das grandes preocupações associada às bactérias do género *Enterococcus* está relacionada com a presença de fatores de virulência, visto que contribuem para a gravidade das infeções. Assim sendo, foi feita pesquisa de alguns desses fatores no presente estudo.

#### 3.7.1. Testes em placa

Para análise fenotípica, foram realizados testes em placa para avaliar a produção de hemolisina/citolisina e gelatinase, sendo que os resultados podem ser observados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados dos testes em placa para pesquisa de fatores de virulência (hemólise e gelatinase).

Código	Hemólise				Gelatinase			
	a	b	c	d	a	b	c	d
EZB1								
EZC2								
EZB2								
EZC3								
EZB3								
EZC4								
EZB4								
EZC5								
EZC6								
EZB7								
EZB8	*	*						
EZB9								
EZB12	*							
EZC15			*					
EZB15								
EZB16								
EZB19								
EZB20								
EZC21								
EZB21								
EZB22								
EZC23								
EZB23								
EZC25								
EZB25								
EZC26 <sub>e</sub>								
EZB27								
EZC28								
EZB28								
EZC29								
EZB29								
EZB30								
EZC32								
EZB32								

Legenda: Verde: Positivo; Vermelho: Negativo; Cinza: Amostra excluída nos testes fenotípicos; a, b, c, d: quatro colônias características de cada amostra; \*: α-hemolítico (halo de coloração esverdeada, *i.e.*, hemólise parcial).

Recorrendo ao meio de cultura Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo, foi possível analisar a atividade hemolítica dos enterococos em estudo. Na figura 10 é possível observar halos transparentes nas amostras EZB7c, EZB9a e EZB9B, correspondentes a  $\beta$ -hemólise; os halos esverdeados observados em EZB8a e EZB8b correspondem por sua vez a  $\alpha$ -hemólise; a ausência de halo na amostra EZB7d corresponde a  $\gamma$ -hemólise (ausência de hemólise). A  $\alpha$ -hemólise é caracterizada por uma hemólise não total, associada com a perda parcial de hemoglobina pelas hemácias, que resulta no aparecimento de uma zona esverdeada à volta das colónias, enquanto a  $\beta$ -hemólise é caracterizada pela lise completa das hemácias presentes no meio de cultura, surgindo um halo transparente à volta das colónias produtoras (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

Cerca de 43% (50/117) dos isolados foram considerados hemolíticos, visto que foi observada a formação de halos à volta das colónias (Figura 12). Tendo em conta que a produção de hemolisina/citolisina contribui para a gravidade das infeções por enterococos (Semedo, et al., 2003b), o resultado obtido pode ser algo preocupante. De entre as bactérias consideradas hemolíticas, 92% (46/50) foram consideradas  $\beta$ -hemolíticas e 8% (4/50) foram consideradas  $\alpha$ -hemolíticas.

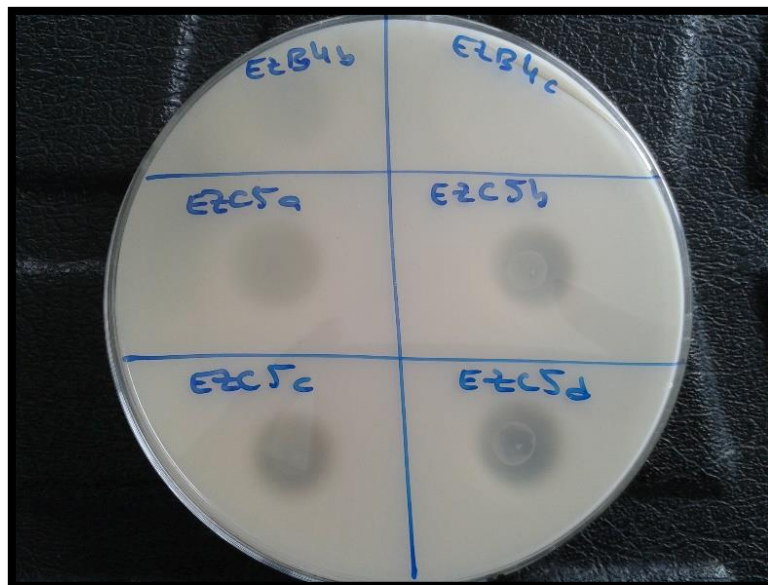
**Figura 12.** Teste de fatores de virulência em placa – hemólise (fotografia original).



Para pesquisa de produção de gelatinase utilizou-se o meio Gelatine Peptone Agar, no qual os resultados positivos correspondem à formação de halos transparentes à volta das colónias produtoras desta enzima. Na Figura 13 podem ser observados halos transparentes nas amostras EZB4b, EZC5a, EZC5b, EZC5c e EZC5d, correspondendo a amostras gelatinase positivas; a ausência de halo, visível na amostra EZB4c, corresponde à não produção da enzima gelatinase. Assim, os resultados indicaram que cerca de 23% (27/117) dos isolados eram gelatinase positivos. Segundo Semedo et al. (2003), a gelatinase é um fator de virulência

frequentemente observado, sendo característico maioritariamente da espécie *E. faecalis*. A identificação dos enterococos em estudo ao nível da espécie pode comprovar esta associação entre o teste de gelatinase e a espécie presente.

**Figura 13.** Teste de fatores de virulência em placa – gelatinase (fotografia original).



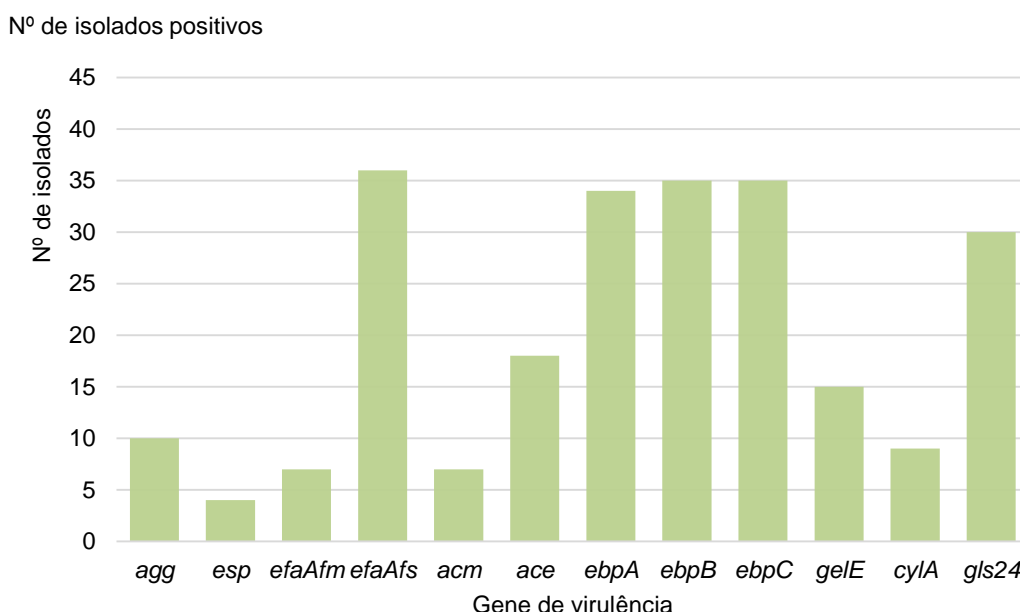
Seria ainda importante identificar os isolados produtores de lipase, uma vez que bactérias que possuem a capacidade de degradar lípidos poderão também possuir vantagem adaptativa em locais de infeção (Semedo et al., 2003a).

### 3.7.2. Pesquisa de genes de virulência

Os enterococos podem possuir no seu genoma vários genes que contribuem direta ou indiretamente para a sua virulência e, portanto, a análise da presença de alguns destes genes é de suma importância, tendo para isso sido aplicada a técnica de amplificação por PCR com recurso a *primers* específicos.

Os genes testados incluíram os que codificam para várias adesinas como a substância de agregação (*agg*), a proteína de superfície (*esp*), adesinas da parede celular de *E. faecium* e *E. faecalis* (*efaA<sub>fm</sub>* e *efaA<sub>fs</sub>*, respetivamente), adesinas de ligação ao colagénio de *E. faecium* e *E. faecalis* (*acm* e *ace*, respetivamente) e fímbrias associados a endocardite/formação de biofilme pela espécie *E. faecalis* (*ebpABC*); fatores secretados como a gelatinase (*gelE*) e a citolisina (*cylA*); e a proteína de *stress* geral para *Enterococcus* (*gls24*). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.

**Figura 14.** Genes de virulência pesquisados nos 46 isolados de enterococos representantes da coleção em estudo.



O gene *agg* foi detetado em 22% (10/46) dos isolados testados. Este gene codifica para uma proteína de superfície que medeia a ligação das células dadoras às células hospedeiras que não possuem plasmídeos que respondem a feromonas, contribuindo fortemente para aquisição e/ou disseminação dos elementos genéticos de virulência (Ribeiro, et al., 2011). A expressão deste fator de virulência é preocupante, uma vez que promove a disseminação de plasmídeos, está envolvido na colonização e internalização nas células hospedeiras, resultando na invasão dos tecidos e confere a capacidade de resistir à ação dos macrófagos uma vez no interior do hospedeiro, facilitando a evasão ao sistema imunitário (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012). Seria assim interessante verificar se os isolados que possuem o gene *agg* possuem igualmente genes que codificam feromonas sexuais.

A presença do gene *esp* foi detetada em 9% (4/46) dos isolados, pertencendo à espécie *E. faecalis*. A expressão deste gene encontra-se relacionada com a adesão a superfícies bióticas e abióticas e com a evasão ao sistema imunitário, sendo que sua associação a *E. faecalis* enfatiza novamente o potencial de patogenicidade associado a esta espécie (Semedo-Lemsaddek, et al., 2012).

Relativamente ao gene *efaA<sub>fm</sub>*, que codifica uma adesina específica da parede de *E. faecium*, a sua presença foi detetada, tal como em estudos anteriores (Diarra, et al., 2010), apenas nos isolados identificados como *E. faecium*. Todos os isolados pertencentes a essa espécie apresentaram este gene.

O gene *efaA<sub>fs</sub>* foi identificado em 78% (36/46) dos isolados, sendo que 100% (36/36) foram identificados como *E. faecalis*. Apesar do gene *efaA<sub>fs</sub>* codificar uma adesina específica da parede de *E. faecalis*, os resultados estão de acordo com um estudo realizado por Semedo

et al. (2003a), que revelou que o gene *efaA<sub>fs</sub>* estava presente na maioria das estirpes estudadas, sugerindo a disseminação desta adesina independentemente da origem e da espécie.

O gene *acm* foi detectado em 100% (7/7) dos isolados da espécie *E. faecium* e o gene *ace* em 46% (18/39) dos representantes identificados como *E. faecalis*. A proteína Acm é uma adesina de ligação ao colagénio tipo I da espécie *E. faecium*. Esta adesina é de grande importância no processo de infeção, pois o colagénio é a proteína estrutural principal da matriz extracelular e a mais abundante em vertebrados (Semedo-Lemsaddek et al., 2012). Por seu lado, a proteína Ace é um componente específico da superfície microbiana de *E. faecalis* que reconhece as moléculas da matriz extracelular, mediando a ligação do colagénio tipo I e IV e da laminina (Semedo-Lemsaddek et al., 2012).

Pelo menos um dos genes *ebpABC* foi detectado em 76% (35/46) dos representantes, mas a frequência verificada do gene *ebpA* foi diferente da verificada para os genes *ebpB* e *ebpC*: 74% (34/46) para o primeiro e 76% (35/46) para os restantes. Ribeiro et al. (2011) verificaram igualmente elevada incidência destes genes.

Foi ainda possível observar que 75% (9/12) dos isolados que se mostraram positivos para a atividade da gelatinase possuíam o gene *gelE*, que está diretamente associado a esta característica. Além disso, observou-se que 25% (3/12) dos isolados *gelE*<sup>+</sup> são negativos para atividade da gelatinase sendo que, segundo Semedo et al. (2012), este fenómeno pode ser atribuído a uma deleção cromossomal contendo parte do *loci fsr*.

Apesar de 41% (19/46) dos representantes terem demonstrado ser β-hemolíticos, apenas se verificou a presença do gene *cylA* em 37% (7/19). Semedo-Lemsaddek et al. (2003b), ao revelar associações significativas entre a β-hemólise e o operão *cyl*, sugeriu que todas as estirpes β-hemolíticas devem possuir todo o conjunto de genes *cyl*. Não obstante, existem relatos de isolados β-hemolíticos que não possuem o gene *cylA*, sugerindo ou a existência de um elemento genético desconhecido responsável pela hemólise (Macovei & Zurek, 2006; Diarra, et al., 2010) ou variabilidade génica do gene em causa (Semedo, et al., 2003b). Assim, para a avaliação da capacidade hemolítica de enterococos, torna-se bastante importante a realização do *screening* de todos os genes *cyl* em conjunto com a atividade β-hemolítica (Semedo, et al., 2003b; Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008; Semedo-Lemsaddek, et al., 2012), tal como foi feito no presente estudo, de maneira a tentar diminuir erros associados.

Relativamente ao gene *gls24*, a sua presença foi detetada apenas nos isolados identificados como *E. faecalis*, tal como em estudos anteriores (Teng, Nannini, & Murray, 2005). Dos isolados dessa espécie, cerca de 77% (30/39) apresentaram este gene.

Pelo cálculo da probabilidade de associação dos genes de virulência observados em cada isolado e o local de recolha do mesmo, através do teste exato de Fisher, não foi notada relação entre nenhum desses fatores (Anexo 5).



### 3.8. Relação entre a doença periodontal e a endocardite bacteriana

Tendo em conta a fisiopatogenia da endocardite bacteriana e a sua etiologia, que inclui as bactérias do género *Enterococcus* (Spagnol et al., 2006; Cavaguchi et al., 2010), este estudo teve como principal objetivo verificar a possível associação entre estes fatores.

Dos 32 animais em estudo (64 amostras, de coração e boca), foi obtido um total de 117 isolados identificados como pertencendo ao género *Enterococcus*. Das 34 amostras de onde se obtiveram os isolados, 62% (21/34) eram provenientes da gengiva e 38% (13/34) do coração. Porém, apenas em 31% (10/32) dos animais se obteve positividade para a gengiva e o coração respetivo. Dos 10 animais que demonstraram positividade para a presença de enterococos em ambos os tecidos estudados, 70% apresentaram a mesma espécie na gengiva e no coração, tal como revelado pela realização de tipagem molecular. Estes valores são pouco esclarecedores relativamente à associação da doença periodontal com a endocardite bacteriana. No entanto, o facto de a maior parte dos animais em que foi possível isolar enterococos apresentar a mesma espécie nos dois tecidos estudados, demonstra a importância da continuação deste estudo, realizando uma amostragem mais significativa e homogénea. Uma vez que a doença periodontal tem uma prevalência elevada nos cães, é necessário avaliar as consequências desta doença, não só para os animais, mas também para as pessoas que com eles contactam, dado o potencial de patogenicidade das bactérias presentes na boca.

Existe evidência em medicina humana que a bacteriemia e a inflamação sistêmica secundária a doença periodontal afeta negativamente diversos órgãos e pode estar relacionado com inúmeras doenças, nomeadamente endocardite bacteriana subaguda e aterosclerose (Pavlica et al., 2008). Em medicina veterinária está ainda por esclarecer esta relação, sendo que até recentemente não existiam estudos acerca deste assunto. Porém, já se começa a tornar claro que o impacto da doença periodontal na saúde dos cães é real e deve ser tida em conta. Os cães podem ter uma vida mais confortável se for promovida uma higiene oral adequada durante toda a sua vida. Os donos devem ser educados para esse facto, sendo cada vez mais necessária a existência de um médico veterinário especializado em odontologia em cada clínica, dado a incidência elevada de doenças da cavidade oral.

Tendo em conta o potencial risco da doença periodontal para a saúde dos animais de companhia, nomeadamente o desenvolvimento de endocardites bacterianas e sendo que ambas as doenças referidas podem ser provocadas por bactérias do género *Enterococcus* desenvolveu-se o estudo apresentado. Foi selecionado este género bacteriano devido ao potencial risco de disseminação de enterococos virulentos e resistentes que é, nos dias de hoje, uma grande preocupação.

No presente estudo, o objetivo foi tentar elucidar acerca do papel de enterococos da cavidade oral de cães com doença periodontal no aparecimento de endocardites bacterianas, além de verificar a disseminação e a diversidade destas bactérias nos tecidos avaliados e posteriormente avaliar o seu potencial de patogenicidade, pela pesquisa de resistências a agentes antimicrobianos e de fatores de virulência.

A partir dos 32 animais em estudo, foi observada a presença de enterococos, através de métodos fenotípicos e moleculares, em cerca de 66% (21/32) das gengivas e em cerca de 44% dos corações, permitindo-nos verificar que estas bactérias se encontram amplamente distribuídas pelos tecidos em estudo.

A avaliação das relações de semelhanças entre os 117 isolados identificados como *Enterococcus* spp. e o cálculo de índices de diversidade evidenciaram que a amostragem permitiu isolar indivíduos distintos e permitiu verificar ainda que estes agruparam de forma independente da sua origem, não existindo grupos específicos de cada local de amostragem. Permitiu ainda selecionar 46 representantes da amostragem, para posteriores procedimentos. A identificação ao nível da espécie permitiu verificar uma elevada percentagem de isolados das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Dos 46 isolados selecionados, cerca de 81% foram identificados como pertencentes à espécie *E. faecalis*, cerca de 15% como pertencentes à espécie *E. faecium*, sendo que cerca de 4% foi considerado *Enterococcus* sp., visto não pertencerem a nenhuma das espécies testadas.

A resistência a diversos antimicrobianos testados, assim como a presença de genes de virulência que codificam para adesinas, fatores secretados e um regulador de resposta ao stress da espécie *E. faecalis*, evidenciaram o potencial de patogenicidade associado a estes isolados. Isto porque, num eventual contacto com o hospedeiro, estes possuem o necessário para aderirem e evadirem e para persistirem no interior do mesmo. O potencial risco de patogenicidade está principalmente associado a isolados identificados como pertencentes à espécie dominante no presente estudo (*E. faecalis*), visto que foi possível detetar um maior número de fatores de virulência.

O perfil de resistência obtido é também preocupante, tornando limitante a ação de antimicrobianos com diferentes alvos e indo ao encontro do problema associado à crescente limitação das opções terapêuticas, em caso de infeção. Dado que se observou 57% de resistência à gentamicina que, de acordo com Moreno et al. (2006), é considerado um dos antimicrobianos mais importantes no tratamento de infeções por estirpes multirresistentes de enterococos, estamos perante uma situação alarmante. Porém, o facto de apenas 7% dos isolados se ter mostrado resistente à vancomicina, outro antimicrobiano de uso em medicina humana para o tratamento de infeções por estirpes de enterococos multirresistentes (Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, & Vuyst, 2006), é um dado positivo no que ao risco para a saúde pública diz respeito.

Os resultados do presente estudo não providenciaram evidência que suporte a sugestão de que a doença periodontal seja um fator de risco para o aparecimento de endocardite bacteriana, existindo diversos fatores que devem ser descartados uma vez que podem influenciar tanto a doença periodontal como a patologias em órgãos distantes, nomeadamente a idade, dieta e condição corporal aumentada ou reduzida, todas variáveis que podem comprometer os mecanismos de imunidade inata, levando a que a sua alteração possa ter grande influência em qualquer sistema do corpo.

Estudos prospetivos devem ser realizados neste sentido, para definir mais concretamente o papel da doença periodontal no aparecimento de doenças sistémicas que contribuem para elevadas taxas de morbilidade e mortalidade.

## Bibliografia

---

- Albuquerque, C., Morinha, F., Requicha, J., Martins, T., Dias, I., Guedes-Pinto, H., Bastos, E. & Viegas, C. (2011). Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *The Veterinary Journal*, 191(3):299-305.
- Altman, D., Machin, D., Bryant, T., & Gardner, M. (1989). *Statistics with confidence*. London, England: British Medical Journal Publications.
- Aminov, R., Garrigues-Jeanjean, & Mackie, R. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of *primers* for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1):22-32.
- Anónimo (2000). Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux – Partie 2: Méthode par filtration sur membrane - NF EN ISO 7899-2.
- Arsene, S., & Leclercq, R. (2007). Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51(9):3254-3258.
- Barbosa, J., Ferreira, V., & Teixeira, P. (2009). Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*, 26(5):527-532.
- Baylis, C. (1987). Effects of administered thromboxane on the intact, normal rat kidney. *Renal Physiology*, 10(2):110-121.
- Brandborg, L., & Goldman, I. (1990). Bacterial and miscellaneous infections of the liver. Em D. Zakim, & T. Boyer, *Hepatology: a textbook of liver disease* (pp. 1086-1098). Philadelphia: WB Saunders.
- Butler, K. (2006). Enterococcal infection in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 17(13):128-139.
- Calvert, C., Greene, C., & Hardie, E. (1985). Cardiovascular infections in dogs: epizootiology, clinical manifestations, and prognosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(6):612-616.
- Carlos, A., Santos, J., Smedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M., & Tenreiro, R. (2009). Enterococci from artisanal dairy products show high levels of adaptability. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2):194-199.
- Carranza, F., & Takei, H. (2006). Rationale for periodontal treatment. Em M. Newman, H. Takei, P. Klokkevold, & F. Carranza, *Carranza's clinical periodontology* (pp. 630-635). St. Louis: WB Saunders.
- Cavaguchi, D., Pincelli, V., Bochio, M., Ribeiro, R., Bracarense, A., & Pereira, P. (2010). Aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos da endocardite bacteriana em cães: 28 casos (2003-2008). *Ciências Agrárias, Londrina*, 31(1):183-190.
- Center, S. (1990). Hepatobiliary infections. Em C. Green, *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 146-156). Philadelphia: WB Saunders.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013a). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. USA: CLSI.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013b). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard – fourth edition. USA: CLSI.
- Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L., & Huebner, J. (2006). Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiology*, 6:60.
- Crossley, D. (2005). Dentistry for small animal practitioners: periodontal disease in carnivores. *Dentistry for small animal practitioners* (pp. 1-17). U.K.: DaCross Services.
- Das, I., & Gray, J. (1998). Enterococcal bacteremia in children: a review of seventy-five episodes in a pediatric hospital. *Pediatrics Infectious Diseases Journal*, 17(12):1154-1158.
- DeBowes, L., Mosier, D., Logan, E., Harvey, C., Lowry, S., & Richardson, D. (1996). Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 13(2):57-60.
- Delgado, S., Fracchetti, F., Mayo, B., & Torriani, S. (2011). Development and validation of a multiplex PCR-based DNA microarray hybridization method for detecting bacterial antibiotic resistance genes in cheese. *International Dairy Journal*, 21(3):149-157.
- Deshpande, R., Khan, M., & Genco, C. (1998). Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 66(11):5337-5343.
- Diarra, M., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., & Topp, E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp: characterization of isolates from broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24):8033-8043.
- Dorn, B., Dunn, W., & Progulske-Fox, A. (1999). Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infection and Immunity*, 67(11):5792-5798.
- Eaton, T., & Gasson, M. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4):1628-1635.
- Facklam, R., Carvalho, M., & Teixeira, L. (2002). History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In M. Gilmore, D. Clewell, P. Courvalin, G. Dunne, B. Murray, & L. Rice, *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance* (pp. 1-54). Washington, DC.: ASM Press.
- Fournier, D., Mouton, C., Lapierra, P., Kato, T., Okuda, K., & Ménard, C. (2001). *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3):1179-1189.
- Franz, C., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotic and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2):125-140.
- Franz, C., Muscholl-Silberhorn, A., Yousif, N., Vancanneyt, M., Swings, J., & Holzapfel, W. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9):4385-4389.
- Franz, C., Stiles, M., Schleifer, K., & Holzapfel, W. (2003). Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3):105-122.

- Furumura, M., Figueiredo, P., Carbonell, G., Darini, A., & Yano, T. (2006). Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3):230-236.
- Garrity, G. L. (6 de março de 2007). *Part 9 – The Bacteria: Phylum Firmicutes: Class “Bacilli. The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea*. Obtido de The taxonomic outline of bacteria and archaea: <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/18>
- Gioso, M. (2007). *Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais*. São Paulo - Brasil: Manole.
- Gioso, M., Shofer, F., Barros, P., & Harvey, C. (2001). Mandible and mandibular first molar tooth measurements in dogs: relationship of radiographic height to body weight. *Journal of Veterinary Dentistry*, 18(2):65-82.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2):163-171.
- Gonlussen, G., Ergin, M., Paydas, S., & Tunali, N. (2001). The expression of cytoskeletal proteins (alpha-SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: a comparison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis. *International Urology and Nephrology*, 33(2):299-305.
- Gould, K., Ramirez-Ronda, C., Holmes, R., & Sanford, J. (1975). Adherence of bacteria to heart valves in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 56(6):1364-1370.
- Grandjean, D., & Haymann, F. (2012). *Enciclopédia do cão*. Itália: Royal Canin.
- Guarro, J., Gene, J., & Stchigel, A. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3):454-500.
- Hamlin, R. (1990). Identifying the cardiovascular and pulmonary diseases that affect old dogs. *Veterinary Medicine*, 85(5):483-497.
- Hardham, J., Reed, M., Wong, J., King, K., Laurinat, B., Sfintescu, C., & Evans, R. (2005). Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine*, 23(24):3148-3156.
- Hargreaves, K., & Cohen, S. (2011). *Cohen's pathway of the pulp*. St. Louis: Mosby.
- Hartzell, J., Torres, D., Kim, P., & Wortmann, G. (2005). Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *The American Journal of the Medical Sciences*, 329(4):178-180.
- Harvey, C., & Emily, P. (1993). *Small animal dentistry*. U.S.A.: Mosby.
- Hennet, P. (2006). Canine nutrition and oral health. Em V. Borge, D. Elliot, & P. Pibot, *Encyclopedia of canine clinical nutrition* (pp. 388-406). France: Royal Canin.
- Herzber, M., & Meyer, M. (1996). Effects of oral flora on platelets; possible consequences in cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, 67(10S):1138-1142.
- Hidron, A., Edwards, J., Patel, J., Horan, T., Sievert, D., Pollock, D., Fridkin, S., National Healthcare Safety Network Team, & Participating National Healthcare Safety Network Facilities (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infectious Control Hospital Epidemiology*, 29(11):996-1011.
- Hoffman, T., & Gaengler, P. (1996). Clinical and pathomorphological investigation of spontaneously occurring periodontal disease in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 37(10):309-316.

- Holmstrom, S. (2005). Geriatric veterinary dentistry: medical and client relations and challenges. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(3):699-712.
- Holmstrom, S., Bellows, J., Juriga, S., Knutson, K., Niemiec, B., & Perrone, J. (2013). 2013 AAHA dental care guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(2):75-82.
- Holmstrom, S., Frost, P., & Eisner, E. (2004). Exodontics. Em S. Holmstrom, P. Frost, & E. Eisner, *Veterinary dental techniques for the small animal practitioner* (pp. 291-338). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Hoskins, J. (2004). The oral cavity and dental disease. Em J. Hoskins, *Geriatrics and gerontology of the dog and cat* (pp. 149-162). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Hunter, P., & Gaston, M. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing schemes: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11):2465-2466.
- Hwang, Y., Ku, H., Lim, S., Park, C., Jung, G., Jung, S., & Nam, H. (2009). Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of enterococci isolated from pigs and chickens in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6):858-862.
- Kataoka, Y., Umino, Y., Ochi, H., Harada, K., & Sawada, T. (24 de Agosto de 2014). *Antimicrobial susceptibility of enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats*. Obtido de The Journal of Veterinary Medical Science: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub\\_13-0576/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_13-0576/_pdf)
- Ke, D., Picard, F., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P., Ouellette, M., & Bergeron, M. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11):3497-3503.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3):123-131.
- Koneman E., Allen S., & Janda W. (2007) *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. Vila Mariana: Guanabara Koogan
- Kyllar, M., & Witter, K. (2005). Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Veterinary Medicine - Czesch*, 50(11):496-505.
- Laflamme, D. (2005). Nutrition for aging cats and dogs and the importance of body condition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(3):713-742.
- Lebreton, F., Riboulet-Bisson, E., Serror, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., Hartke, A., Auffray, Y., & Giard, J. (2009). ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infection and Immunity*, 77(7):2832-2839.
- Leite, S. (2011). *Caracterização de Enterococcus isolados de berbigão na Ria de Aveiro*. Dissertação de Mestrado em Biologia Aplicada. Aveiro: Universidade de Aveiro - Departamento de Biologia.
- Lobprise, H. (2012). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Small Animal Dentistry*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Lofthus, J., Waki, M., Jolkovsky, D., Otomo-Corgel, J., Newman, M., Flemmig, T., & Nachnani, S. (1991). Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *Journal of Periodontology*, 62(10):602-607.

- Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, J., Tenreiro, R., & Crespo, M. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 103(2):191-198.
- Lowe, A., Lambert, P., & Smith, A. (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infection and Immunity*, 63(2):703-706.
- Lucas, V., & Roberts, G. (2000). Odontogenic bacteremia following tooth cleaning procedures in children. *Pediatric Dentistry*, 22(2):96-100.
- Lund, E., Armstrong, P., Kirk, C., Kolar, L., & Klausner, J. (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(9):1336-1341.
- MacDonald, K. (2009). Infective endocarditis. Em J. Bonagura, & D. Twedt, *Current Veterinary Therapy* (pp. 786-791). St. Louis: Saunders Elsevier.
- MacDonald, K. (2010). Infective endocarditis in dogs: diagnosis and therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(4):665-684.
- MacDougall, D., Cook, T., Steward, A., & Cattell, V. (1986). Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International*, 29(6):1144-1151.
- MacFaddin, J. (1985). *Media for the isolation-cultivation-identification-maintenance of medial bacteria, vol. I*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Macovei, L., & Zurek, L. (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of Enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6):4028-4035.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D., Rice, L., Stelling, J., Struelens, M., Vatopoulos, A., Weber, J., & Monnet, D. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268-81.
- Marretta, S. L., Burgess-Cassler, A., McClure, G. J., Buelow, M., & Finn, M. (2012). Pilot evaluation of a novel test strip for the assessment of dissolved thiol levels, as an indicator of canine gingival health and periodontal status. *The Canadian Veterinary Journal*, 53(12):1260-1265.
- Merin, R. (2006). Results of periodontal treatment. Em M. Newman, H. Takei, P. Klokkevold, & F. Carranza, *Carranza's clinical periodontology* (pp. 1206-1214). St. Louis: WB Saunders.
- Mims, C., Nash, A., & Stephen, J. (2001). *Mims' pathogenesis of infectious disease*. London, UK: Academic Press.
- Mochizuki, T., Sugie, N., & Uehara, M. (1997). Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*, 40(11-12):405-409.
- Moreno, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1):1-24.



- Nallapareddy, S., Wenxiang, H., Weinstock, G., & Murray, B. (2005). Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 187(16):5709-5718.
- Nelson, R., & Couto, C. (2009). *Small animal internal medicine*. St. Louis: Mosby Elsevier.
- Nielsen, H., Flores-Mireles, A., Kau, A., Kline, K., Pinkner, J., Neiers, F., Normark, S., Henriques-Normark, B., Caparon, M., & Hultgren, S. (2013). Pilin and sortase residues critical for endocarditis and biofilm-associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 195(19):4484-4495.
- Niemiec, B. (2008). Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2):72-80.
- Novak, M. (2006). Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. Em M. Newman, H. Takei, P. Klokkevold, & F. Carranza, *Carranza's clinical periodontology* (pp. 100-109). St. Louis: WB Saunders.
- Pacheco, M. (2011). Endocardite bacteriana: revisão de literatura. Monografia para obtenção do título de especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais. Paraná: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais.
- Pavlica, Z., Petelin, M., Polona, J., Erzen, D., Crossley, D., & Skaleric, U. (2008). Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 25(2):97-105.
- Peddle, G., Drobatz, K., Harvey, C., Adams, A., & Sleeper, M. (2009). Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(1):100-107.
- Pennman, S., & Harvey, C. (1992). Periodontal disease. Em C. Harvey, & H. Orr, *Manual of small animal dentistry* (pp. 37-48). West Sussex: KCO.
- Poeta, P., Costa, D., Klibi, N., Rodrigues, J., & Torres, C. (2006). Phenotypic and genotypic of gelatinase and  $\beta$ -haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53(5):203-208.
- Quirynen, M., Teughels, W., Kinder, H., & Newman, M. (2006). Microbiology of periodontal diseases. Em M. Newman, H. Takei, P. Klokkevold, & F. Carranza, *Carranza's clinical periodontology* (pp. 134-169). St. Louis: WB Saunders.
- Ribeiro, T., Oliveira, M., Fraqueza, M., Lauková, A., Elias, M., Tenreiro, R., Barreto, A., & Smedo-Lemsaddek, T. (2011). Antibiotic resistance and virulence factors among enterococci isolated from chouriço a traditional Portuguese dry fermented sausage. *Journal of Food Protection*, 74(3):465-469.
- Riboldi, G., Mattos, E., Frazzon, A., Alves d'Azevedo, P., & Frazzon, F. (2008). Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species from food in Southern Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 48(1):31-37.
- Rush, J., & Bonagura, J. (2008). Doenças cardíacas valvulares. Em J. Birchard, & G. Sherding, *Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais* (pp. 1554-1558). São Paulo: Roca.
- Santos, S. (2011). *The dual role of enterococci in food technology: bacteriocin production versus pathogenicity potential*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.

- Sedor, J., Huang, S., Gronich, J., Nakazato, Y., Gordon, G., & King, C. (1993). Cytokines, mesangial cell activation and glomerular injury. *Kidney International*, 39:65S-70S.
- Semedo, T., Santos, M., Lopes, M., Figueiredo Marques, J., Barreto-Crespo, M., & Tenreiro, R. (2003a). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1):13-22.
- Semedo, T., Santos, M., Martins, P., Lopes, M., Marques, J., Tenreiro, R., & Crespo, M. (2003b). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2569-2576.
- Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M., & Tenreiro, R. (2012). *Enterococcus and safety*. New York: Nova Science Publishers.
- Semedo-Lemsaddek, T., Tenreiro, R., Alves, P., & Barreto-Crespo, M. (2010). *Enterococcus*. Em D. Liu, *Molecular detection of foodborne pathogens* (pp. 157-179). Boca Raton: CRC Press.
- Semedo-Lemsaddek, T., Tenreiro, R., Alves, P., & Barreto-Crespo, M. (2011). *Enterococcus*. Em D. Liu, *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 231-248). Boca Raton: CRC Press.
- Shankar, V., Baghdayan, A., Huycke, M., Lindahl, G., & Gilmore, M. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67(1):193-200.
- Silva, J. (2009). *Fenómenos cadavéricos (alterações post-mortem)*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Smith, M., Smith, E., La Croix, N., & Mould, J. (2003). Orbital penetration associated with tooth extration. *Journal of Veterinary Dentistry*, 20(1):8-17.
- Solheim, M., Aakra, A., Vebø, H., Snipen, L., & Nes, I. (2007). Transcriptional responses of *Enterococcus faecalis* V583 to bovine bile and sodium dodecyl sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18):5767-5774.
- Soll, D. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2):332-70.
- Spagnol, C., Loretto, A., Oliveira, E., Oliveira, R., & Driemeier, D. (2006). Aspectos epidemiológicos da endocardite bacteriana em cães: 54 casos (2000-2005). *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(3):255-260.
- Svec, P., & Devriese, L. (2009). Genus *Enterococcus*. Em De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., Whitman, B., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 3 (pp. 594-607). Dordrecht: Springer.
- Sykes, J., Kittleson, M., Chomel, B., MacDonald, K., & Pesavento, P. (2006). Clinicopathologic findings and outcome in dogs with infective endocarditis: 71 cases (1992-2005). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 228(11):1735-1746.
- Taboada, J., & Meyer, D. (1989). Cholestasis associated with extrahepatic bacterial infection in five dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(4):216-220.
- Takahasi, T., Fujisawa, T., Yamamoto, K., Kijima, M., & Takahashi, T. (2000). Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix* strains isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 47(4):311-313.

- Tanasupawat, S., Sukontasing, S., & Lee, J. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7):1630-1634.
- Teng, F., Jacques-palaz, K., Weinstock, G., Murray, B., & Haven, W. (2010). Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 70(4):2010-2015.
- Teng, F., Nannini, E., & Murray, B. (2005). Importance of gls24 in virulence and stress response of *Enterococcus faecalis* and use of the GlS24 protein as a possible immunotherapy target. *Journal of Infectious Diseases*, 191(3):472-480.
- Top, J., Willems, R., Blok, H., de Regt, M., Jalink, K., Troelstra, A., Goorhuis, B., & Bonten, M. (2007). Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3):316-319.
- Tuncer, B., Ay, Z., & Tuncer, Y. (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turkish Journal of Biology*, 37(4):443-449.
- Valenzuela, A., Benomar, N., Abriouel, H., Pulido, R., Cañamero, M., & Gálvez, A., (2012). Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(4):701-711.
- Valenzuela, A., Omar, N., Abriouel, H., López, R., Ortega, E., Cañamero, M., & Gálvez, A. (2008). Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8):2648-2652.
- Valenzuela, A., Omar, N., Abriouel, H., López, R., Veljovic, K., Cañamero, M., Topisirovic, M., Gálvez, A. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20(4):381-385.
- Vebø, H., Solheim, M., Snipen, L., Nes, I., & Brede, D. (2010). Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. *PloS one*, 5(8):e12489.
- Velkers, F., van de Graaf-Bloois, L., Wagenaar, J., Westendorp, S., van Bergen, M., Dwars, R., & Landman, W. (2011). *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *The Veterinary Quarterly*, 31(1):3-17.
- Verstraete, F., Kass, P., & Terpak, C. (1998). Diagnostic value of full-mouth radiography in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 59(6):692-695.
- Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., & Biavasco, F. (2011). Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Current Microbiology*, 62(5):1438-1444.
- Vos, P., G.M., G., Jones, D., N.R., K., Ludwing, W., & Rainey, F. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer.
- Wells, C., Jechorek, R., & Erlandsen, S. (1990). Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *Journal Infectious Disease*, 162(1):82-90.

- Whyte, A., Bonastre, C., Monteagudo, L., Les, F., Obon, J., Whyte, J., & Tejedor, M. (2014). Canine stage 1 periodontal disease: A latent pathology. *The Veterinary Journal*, 201(1):118-120.
- Wiggs, R., & Lobprise, H. (1997). *Periodontology*. Philadelphia: Lippincott Raven.
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2008). *Microbiology*. New York: McGraw-Hill International Edition.
- Wirth, R. (1994). The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *European Journal of Biochemistry*, 222(2):235-246.
- Zar, J. (1996). *Biostatistical analysis*. London, United Kingdom: Prentice-Hall International Editions.
- Zareba, T., Pascu, C., Hryniewicz, W., & Wadström, T. (1997). Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Current Microbiology*, 34(1):6-11.

## Anexos

**Anexo 1.** Limites dos diâmetros estabelecidos pelo CLSI (2013) para medicina veterinária e para medicina humana, para os antimicrobianos testados no presente estudo.

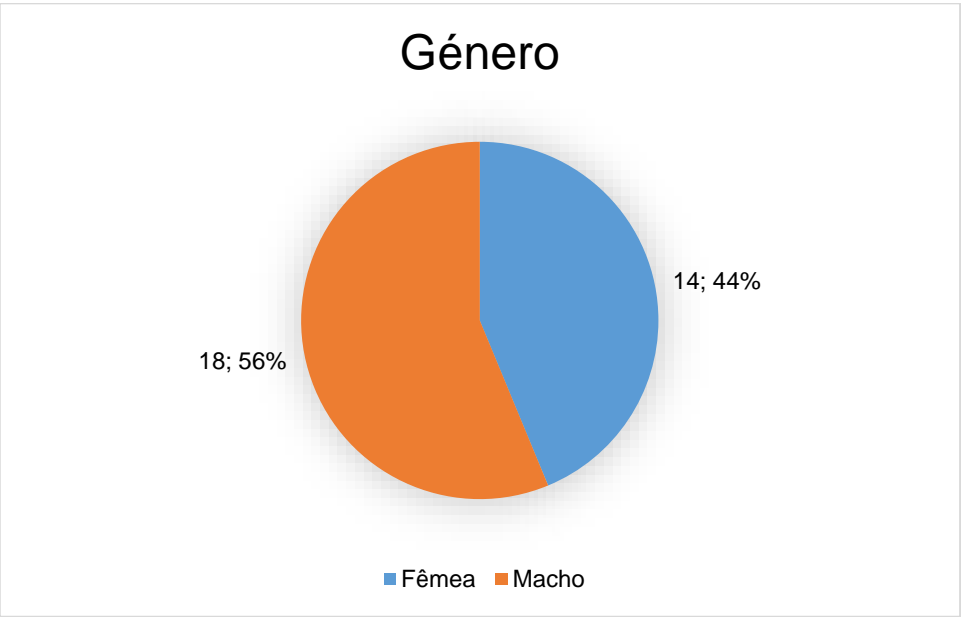
**Tabela 7.** Limites dos diâmetros estabelecidos pelo CLSI (2013) para medicina veterinária e para medicina humana, para os antimicrobianos testados no presente estudo.

Antimicrobiano	Limites dos diâmetros (mm)					
	(CLSI, 2013)					
	Medicina veterinária			Medicina humana		
	S	I	R	S	I	R
Gentamicina (10 µg)	≥15	13 – 14	≤12	-	-	-
Gentamicina (120 µg)	-	-	-	≥10	7 – 9	6
Eritromicina	≥23	14 – 22	≤13	≥23	14 – 22	≤13
Clindamicina	≥21	15 – 20	≤14	≥19	16 – 18	≤15
Cloranfenicol	≥18	13 – 17	≤12	≥18	13 – 17	≤12
Tetraciclina	≥19	15 – 18	≤14	≥19	15 – 18	≤14
Ampicilina	≥17	-	≤16	≥17	-	≤16
Amoxicilina + Ácido clavulânico	≥18	14 – 17	≤13	-	-	-
Imipenem	≥16	14 – 15	≤13	-	-	-
Vancomicina	≥17	15 – 16	≤14	≥17	15 – 16	≤14
Ciprofloxacina	≥21	16 – 20	≤15	≥21	16 – 20	≤15

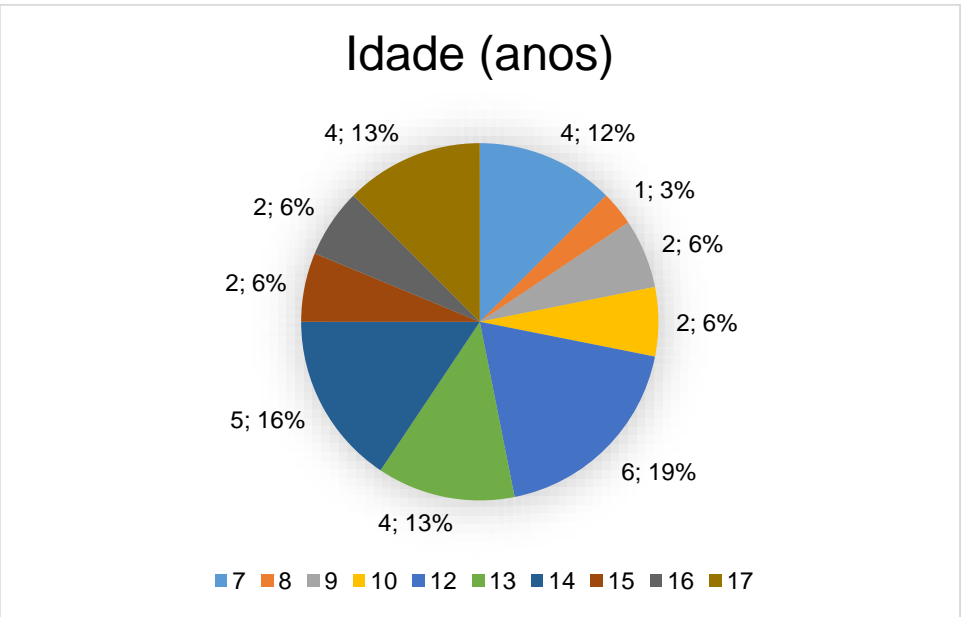
Legenda – S: Sensível; I: Intermédio; R: Resistente.

**Anexo 2.** Prevalências das variáveis presentes na amostragem em estudo.

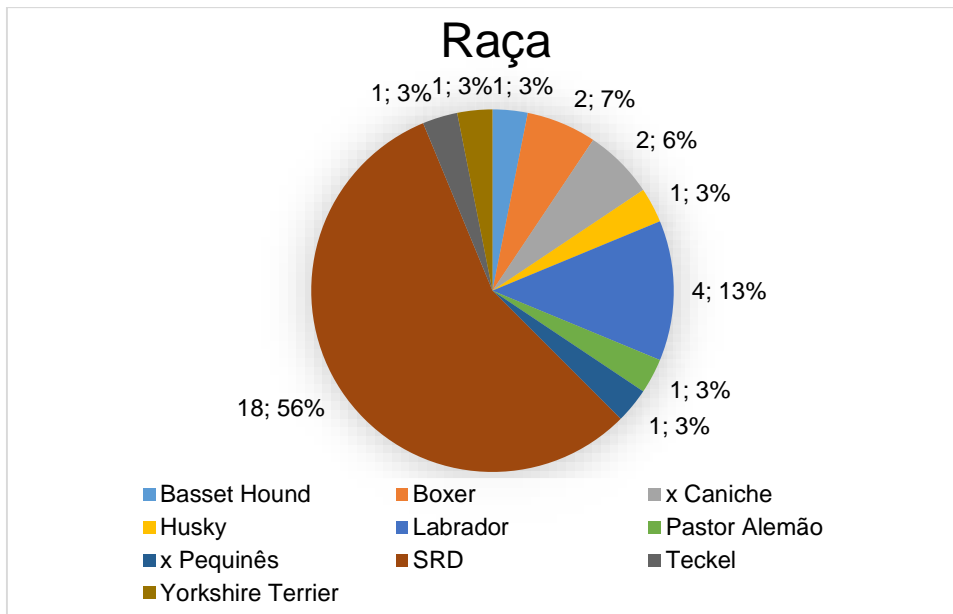
**Figura 15.** Prevalência relativa ao gênero dos animais em estudo.



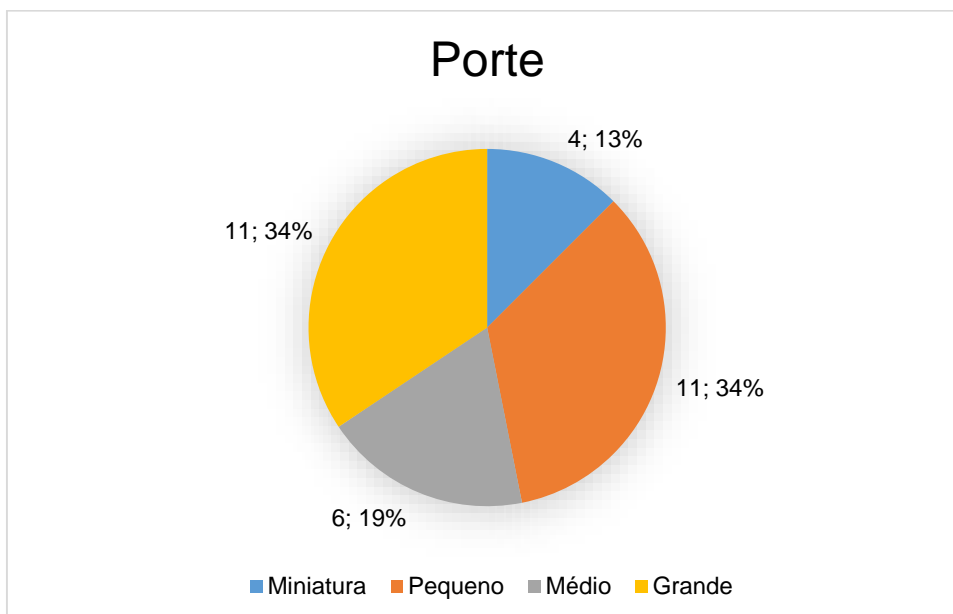
**Figura 16.** Prevalência relativa à idade dos animais em estudo.



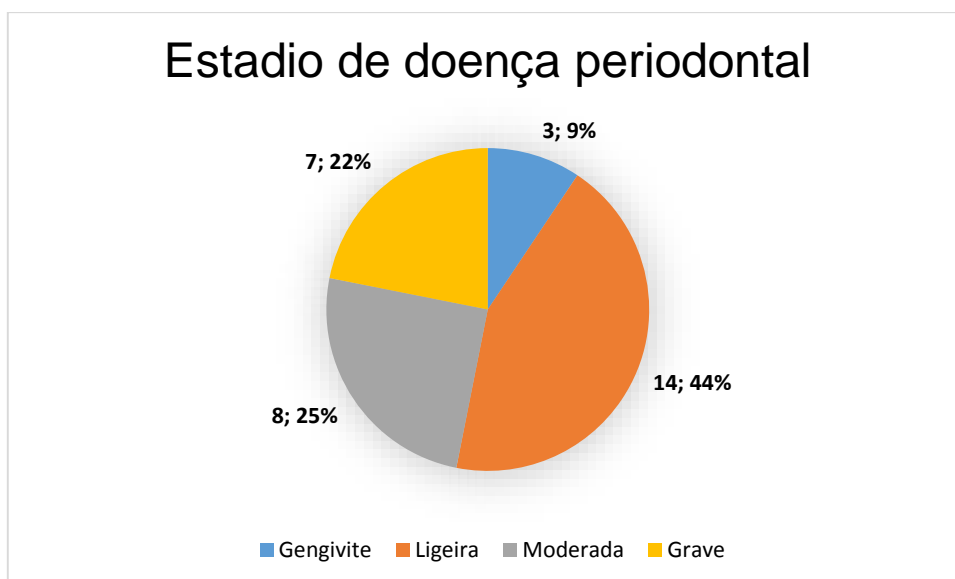
**Figura 17.** Prevalência relativa à raça dos animais em estudo.



**Figura 18.** Prevalência relativa ao porte dos animais em estudo.



**Figura 19.** Prevalência relativa ao estadio de doença periodontal dos animais em estudo.



**Figura 20.** Prevalência relativa à ocorrência de destartarização em vida nos animais em estudo.





**Anexo 3.** Teste exato de Fisher para cálculo da probabilidade de associação entre o gênero, a idade, a raça, o porte e a ocorrência de destartarização em vida e o estadio de doença periodontal.

**Tabela 8.** Probabilidade de associação entre o gênero, a idade, a raça, o porte e a ocorrência de destartarização em vida e o estadio de doença periodontal.

Variável		Estadio de doença periodontal
Gênero	Fêmea	p = 0,9104
	Macho	p = 0,9104
Idade	7 anos	p = 0,4429
	8 anos	p = 1
	9 anos	p = 0,5766
	10 anos	p = 0,5766
	12 anos	p = 0,3698
	13 anos	p = 1
	14 anos	p = 0,5644
	15 anos	p = 0,2802
	16 anos	p = 0,3931
	17 anos	p = 0,173
Raça	Basset Hound	p = 1
	Boxer	p = 0,2802
	x Caniche	p = 0,3931
	Husky	p = 1
	Labrador	p = 0,3532
	Pastor Alemão	p = 1
	Pequinês	p = 0,3125
	SRD	p = 0,05543
	Teckel	p = 0,5625
Porte	Yorkshire Terrier	p = 0,3125
	Miniatura	p = 0,5593
	Pequeno	p = 0,4845
	Médio	p = 0,4826
	Grande	p = 0,07469
Destartarização		p = 0,3125

**Anexo 4.** Teste exato de Fisher para cálculo da probabilidade de associação entre o tecido de origem (boca ou coração) e o perfil de resistências a antimicrobianos obtido.

**Tabela 9.** Probabilidade de associação entre tecido de isolamento e o perfil de resistências a antimicrobianos dos isolados em estudo.

Antimicrobianos	Boca vs. Coração
Gentamicina (10 µg)	p = 0,2314
Eritromicina	p = 0,2893
Cloranfenicol	p = 0,3184
Tetraciclina	p = 0,0504
Ampicilina	p = 0,0916
Amoxicilina + Ácido clavulânico	p = 0,3140
Imipenem	p = 0,0916
Vancomicina	p = 0,1713
Ciprofloxacina	p = 0,3604

Nota: No caso da gentamicina com 120 µg por disco (verificada no CLSI (2013) de medicina humana) e da clindamicina não foi realizada análise estatística uma vez que para a primeira todos os isolados se mostraram sensíveis e para a segunda todos se mostraram resistentes.

**Anexo 5.** Teste exato de Fisher para cálculo da probabilidade de associação entre o tecido de origem (boca ou coração) e o os genes de virulência pesquisados nos isolados em estudo.

**Tabela 10.** Probabilidade de associação entre tecido de isolamento e os genes de virulência pesquisados nos isolados em estudo.

Genes de virulência	Boca vs. Coração
<i>agg</i>	p = 0,1422
<i>esp</i>	p = 0,3784
<i>efa<sub>Afm</sub></i>	p = 0,3184
<i>efa<sub>Afs</sub></i>	p = 0,1840
<i>acm</i>	p = 0,3184
<i>ace</i>	p = 0,1024
<i>ebpA</i>	p = 0,0915
<i>ebpB</i>	p = 0,1335
<i>ebpC</i>	p = 0,1335
<i>gelE</i>	p = 0,2367
<i>cylA</i>	p = 0,2104
<i>gls24</i>	p = 0,2076